

Ultrastruktur und Sekretproteine der Paragoniendrüsen von *Drosophila funebris*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
HANSRUEDI FEDERER
aus Zürich und Berneck SG

begutachtet von
Herrn Prof. Dr. P. S. Chen

Zoologisches Institut der Universität Zürich

Zürich 1981

Fotorotar AG, 8132 Egg

Ultrastruktur und Sekretproteine der Paragoniendrüsen von *Drosophila funebris*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
HANSRUEDI FEDERER
aus Zürich und Berneck SG

begutachtet von
Herrn Prof. Dr. P. S. Chen

Zoologisches Institut der Universität Zürich

Zürich 1981

Fotorotar AG, 8132 Egg



INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	3
1. Zucht	3
2. Sektion der Paragoniendrüsen	3
3. Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie	3
3.1 Konventionelle Präparation	3
3.2 Einbettung in Glycolmetacrylat	4
3.3 Präparation von Sekret	4
3.4 Semidünnschnitte	5
3.5 Ultradünnschnitte	5
3.6 Indirekte Anitgen-Markierung am Ultradünnschnitt	5
4. Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie	5
5. Inspektion der Präparate	6
6. Herstellung des Antiserums	6
7. Ouchterlony-Doppeldiffusionstest	7
8. Immunreplica-Elektrophorese nach Showe et al.	7
9. Rocket-Immunoelektrophorese nach Laurell	8
10. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	9
III. RESULTATE	10
1. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse	
1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege	10
1.1 Hauptzelle	10
1.2 Sekundärzelle	12
1.3 Lumen	14
2. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse	
unmittelbar nach dem Schlüpfen der Fliege (0 Tage)	15
2.1 Hauptzelle	15
2.2 Sekundärzelle	17
2.3 Lumen	18

3. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse	
eines 7 Tage alten, virginellen Männchens	19
3.1 Hauptzelle	19
3.2 Sekundärzelle	20
3.3 Lumen	21
4. Ultrastruktur der Filamente	23
4.1 Filamente der "filamentous bodies"	23
4.2 Gerade Filamente in Filamentbündeln	23
4.3 Spiralige Filamente in Filamentbündeln	24
4.4 Ultrastruktur des 500 Å Filaments	24
5. Antigen-Lokalisierung auf dem Ultradünnschnitt	24
5.1 Hauptzelle	25
5.2 Sekundärzelle	25
5.3 Lumen	25
6. Kopulationsversuche	27
6.1 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen nach einer Kopulationsdauer von 5 Minuten	27
6.2 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 5 Minuten nach erfolgter Kopulation	28
6.3 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 1 Stunde nach erfolgter Kopulation	29
6.4 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 3 Stunden nach erfolgter Kopulation	29
6.5 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen, die nie kopulierten (Kontrolle)	30
7. Serumtiter	32
8. Artspezifität der Paragonienproteine	32
9. Identifikation immunologisch reaktiver Banden im Polyacrylamidgel	35
10. Fluoreszenzmarkierte Paragoniendrüsen	37

11. Sekretionsleistung verschieden alter Paragonien	40
12. Sekretionsleistung von Paragoniendrüsen zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation	41
IV. DISKUSSION	46
1. Präparation	46
2. Paragoniendrüsen aus Puppen und Imagines	46
3. Kopulationsversuche	47
4. Sekretionsmechanismus	48
5. Ultrastruktur der Filamente	49
5.1 "filamentous bodies"	49
5.2 Lumenfilamente	50
6. Indirekte Antigen-Markierung	51
7. Spezielle Funktion der Sekundärzellen	51
8. Die Natur von Lumen- und "filamentous body"-Filamenten	52
9. Artspezifität der Paragonienproteine	53
10. Immunologische Identifikation einzelner Banden im Poly- acrylamidgel	54
11. Fluoreszenzmarkierung	55
12. Sekretionsleistung und Entwicklungsalter	55
13. Sekretionsleistung zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation	57
V. ZUSAMMENFASSUNG	58
VI. LITERATURVERZEICHNIS	60
VII. LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	66
a) in Bildern	66
b) im Text	67
ABBILDUNGEN (Nummern 1 bis 56)	68 - 110

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. S. Chen danke ich herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. Borner und Herrn Dr. Th. Honegger danke ich für ihr Interesse und ihre Hilfsbereitschaft. Ferner danke ich Herrn Dr. J.-C. Perriard für die Hilfe bei der Immunisierung sowie Frau Dr. E. Rungger-Brändli für die grosszügige Ueberlassung von Tubulin und Anti-Tubulin-Serum und Herrn Röbi Sulzer für die Herstellung von wertvollen Laborgeräten. Besonders danke ich meinem Labor-kollegen Jürg Binkert für wertvolle Anregungen und Kritiken.

1. EINLEITUNG

Die akzessorischen Drüsen (Paragonien) der adulten Männchen von Drosophila funebris sind paarige, länglich-sackförmige Organe. Die Zellen des einschichtigen Drüsenepithels sezernieren ein zähflüssiges, heterogenes Sekret ins Lumen. Bisherige Untersuchungen über die Ultrastruktur und Sekretproteine dieser Drüsen wurden vorwiegend an Drosophila melanogaster durchgeführt (für zusammenfassende Literatur siehe Chen, 1971 und 1978, Fowler, 1973).

Elektronenoptisch konnte Bairati (1968) zwei verschiedene Zelltypen feststellen: Hauptzellen und Sekundärzellen. Perotti (1971) betrachtete die Sekundärzellen als weiterentwickelte Hauptzellen, wobei für diesen Zelltyp ein holokriner Sekretionsmechanismus postuliert wurde, während Hauptzellen einen merokrinen Sekretionsmechanismus aufweisen.

Besonders charakteristisch sind die sogenannten "filamentous bodies", die ausschliesslich in den Sekundärzellen vorkommen. Diese mehr oder weniger regelmässigen Kondensationsprodukte von Makromolekülen wurden erstmals von Tandler et al. (1968) bei D. paulistorum beschrieben und als RNS-enthaltende Viren-ähnliche Strukturen interpretiert. Perotti (1970, 1972) beschrieb sie bei D. melanogaster, D. virilis, D. hydei und D. pseudoscura. In einzelnen Drosophila-Arten wurden verschiedene Typen von Filamentkörperchen gefunden. Die Protein-Natur der Filamente wurde von Perotti (1971) nachgewiesen. Aufgrund gewisser Homologien bezeichneten Beaulaton und Perrin-Waldemer (1975) diese Granulen als "grains à microtubules". Ein schlüssiger Beweis für die Mikrotubuli wurde allerdings bisher nicht erbracht.

Die funktionelle Bedeutung des Paragonienssekrets wurde hauptsächlich bei D. melanogaster untersucht. Garcia-Bellido (1964) transplantierte Paragoniendrüsen in Weibchen und beobachtete eine stimulierende Wirkung auf die Eiablage. Dieses

Resultat wurde von Leahy (1966) und Merle (1969) bestätigt. Injektionen von Paragonienextrakt führten zum gleichen Ergebnis (Leahy und Lowe, 1967). Chen und Diem (1961) lokalisierten die papierchromatographisch gefundene männchenspezifische, ninhydrinpositive Substanz, die Fox (1956, 1959) als "Sexpeptid" bezeichnete, in den Paragonien. Die Substanz stimulierte die Eilegerate unbefruchteter Weibchen (Chen und Bühler, 1970).

Weitere Untersuchungen an D. funebris zeigten, dass ein Polypeptid (PS-1), das aus insgesamt 27 Aminosäuren besteht, die Rezeptivität der begatteten Weibchen reduziert, während ein Glycinderivat (PS-2) die Eiablage solcher Weibchen erhöht (Baumann und Chen, 1973 ; Baumann 1974). Beide Substanzen befinden sich ausschliesslich in den Paragoniendrüssen. Ähnliche Beobachtungen konnten bei *Aedes aegypti* (Fuchs et al., 1968; Fuchs und Hiss, 1970), *Musca domestica* (Riemann et al., 1967) und *Melanoplus sanguinipes* (Friedel und Gillot, 1976) festgestellt werden.

Ausser Peptiden und Aminosäurederivaten enthält Paragoniensekret zahlreiche Proteine (von Wyl, 1976; Chen, 1976). Nach Bairati (1968) liegt ihre Bedeutung wahrscheinlich in der Uebertragung der Spermien während der Begattung, sowie in der Konservierung und Verwertung der Spermien in begatteten Weibchen. Lefèvre und Jonsson (1962 und 1964) wiesen einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge Paragoniensekret und der Anzahl erfolgreich transferierter Spermien nach.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ultrastruktur der Paragoniendrüssen von D. funebris einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Nebst allgemein morphologischen Aspekten interessierten uns speziell die Anordnung der Makromoleküle in den sekretorischen Zellen. Ein weiterer Teil befasst sich mit der Charakterisierung bestimmter Protein-Komponenten mittels immunologischer Methoden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Zucht

Fliegen des Wildtyps von Drosophila funebris wurden bei 18°C auf Standardfutter (Mais-Agar-Zucker-Hefe) gezüchtet. Separierte Männchen und Weibchen wurden bei 25°C gehalten.

2. Sektion der Paragoniendrüsen

Die Paragoniendrüsen wurden in einem Tropfen Insektenringergelösung mit Wolframnadeln aus den Männchen herausseziert und je nach Versuch weiterverarbeitet. Für biochemische Untersuchungen wurde die entsprechende Anzahl Paragoniendrüsen in eine adäquate Menge Insektenringer transferiert. Paragoniendrüsen, die für elektronenoptische Untersuchungen bestimmt waren, wurden nochmals in mehreren Tropfen Insektenringergelösung gewaschen und dann direkt ins Fixationsmedium überführt.

3. Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

3.1 Konventionelle Präparation

Um die Entwicklung der Paragonien verfolgen zu können, wurden Drüsen aus Puppen, die 1½ Tage vor dem Schlüpfen standen, sowie aus unmittelbar geschlüpften und 7 Tage alten, isolierten Männchen untersucht. Um den Einfluss der Kopulation auf die Sekretbildung zu prüfen, verwendeten wir Paragonien aus 4-tägigen Männchen nach einer Kopulationsdauer von 5 min oder 5 min 1 und 3 Stunden nach erfolgter Kopulation. Virginelle Männchen des entsprechenden Alters dienten als Kontrolle.

Die gewaschenen Paragoniendrüsen wurden während einer Stunde in 2% Glutaraldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer nach Millonig (1966) pH 7,6 bei Zimmertemperatur fixiert. Anschliessend wurden sie 3 mal während je 10 min in obigem Phosphatpuffer gewaschen. Die Nachfixation erfolgte in 1% OsO₄ im selben Phosphatpuffer bei Zimmertemperatur. Die so fixierten Paragonien-

drüsen wurden einmal mit obigem Phosphatpuffer während 10 min und 2 mal mit H_2O bidest. während je 5 min gewaschen. Die Blockkontrastierung erfolgte in 5% wässriger Uranyl-acetatlösung während 15 min. Anschliessend wurde einmal mit H_2O bidest. (Zimmertemperatur) und einmal mit kaltem ($4^{\circ}C$) H_2O bidest. kurz gewaschen. Die Präparate wurden über die Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100% je 10-15 min bei $4^{\circ}C$) entwässert. Für weitere 15 min wurden die Präparate in 100%-iges wasserfreies Aceton (über Molekularsieb) bei Zimmertemperatur gebracht. Die Infiltration mit dem Harz ERL 4206 (= Spurr) nach Spurr (1969) erfolgte stufenweise: Spurr/Aceton 1:1 übernacht, reiner Spurr während 12 Stunden bei Zimmertemperatur und reiner Spurr bei $70^{\circ}C$ während einem Tag.

3.2 Einbettung in Glycolmetacrylat

Die Einbettung in Glycolmetacrylat wurde nur verwendet, um Antigen-Antikörper-Reaktionen am Ultradünnschnitt ausführen zu können. Es wurden Paragoniendrüsen von 7 Tage alten, virginellen Männchen untersucht. Diese wurden schonend in 1% Glutaraldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (s.o.) während einer Stunde bei Zimmertemperatur fixiert. Anschliessend wurde gewaschen (wie oben). Auf eine Nachfixation und eine Blockkontrastierung wurde verzichtet. Im weiteren wurde nach den Angaben von Spaur und Moriarty (1977) verfahren.

3.3 Präparation von Sekret

Zu diesem Zweck wurden Trägernetzchen mit Parlodion befilmt (2% in Amylacetat) und mit Kohle stabilisiert. Sekret aus frisch seziierten Paragoniendrüsen von 7-tägigen, virginellen Männchen wurde auf den Parlodion-Film aufgetropft und luftgetrocknet. Die Negativ-Kontrastierung erfolgte entweder mit 2% Phosphorwolframsäure pH 7.00 oder mit gesättigter wässriger Uranylacetatlösung während 30 sec bis 3 min.

3.4 Semidünnschnitte

Semidünnschnitte wurden auf einem Reichert Ultramikrotom des Typs Om U3 mit Glasmesser 1,25 μm dick geschnitten, mit Toluidinblau gefärbt und im Lichtmikroskop inspiziert.

3.5 Ultradünnschnitte

Ultradünnschnitte wurden in gleicher Weise mit einem Diamant hergestellt. Sie wurden auf Kupfernetzchen (400 mesh) aufgenommen und anschliessend wie folgt kontrastiert: 1% wässriges Uranylacetat während einer Stunde bei 40°C, dann mit Blei nach Sato (1967) während 20 min bei Zimmertemperatur.

3.6 Indirekte Antigen-Markierung am Ultradünnschnitt

Glycolmetacrylat-Ultradünnschnitte wurden auf Goldnetzchen aufgenommen und nach den Angaben von Gros et al. (1977) weiterbehandelt. Als erster Antikörper diente ein polyspezifisches, selbst hergestelltes Anti-Serum gegen Paragoniensekretproteine (s.u.). Die Verdünnung betrug 2 Teile Serum und 1 Teil H_2O bidest. Der zweite Antikörper, Peroxidase-gekoppelte Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobuline, stammte von DAKO. Die Verdünnung war 1:20 mit H_2O bidest. Die behandelten Schnitte wurden in Abänderung der von Gros et al. (1977) beschriebenen Methode nicht kontrastiert.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt: 1. unbehandelte Schnitte. 2. Behandelte Schnitte mit Präimmunserum als erster Antikörper. Beide Kontrollen wurden gemacht um eventuell auftretende Artefakte erkennen und ausschliessen zu können.

4. Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie

Es wurden Paragoniendrüsen von 7 Tage alten, virginellen Männchen verwendet. Die Präparation erfolgte wie unter 3.1 beschrieben, jedoch wurden die Präparate nach der Entwässerung "Kritisch-Punkt"-getrocknet nach Reimer (1973). Anschliessend wurden sie mit zwei Pinzetten gebrochen und mit

Gold/Palladium (80/20) bestäubt. Die Schichtdicke betrug ca. 200 Å.

5. Inspektion der Präparate

Die unter 4 beschriebenen Präparate wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop Cambridge S4 betrachtet und auf Ilford Pan F photographiert. Alle andern Präparate wurden in einem Zeiss EM 9S-2 Transmissionselektronenmikroskop untersucht und auf Kodak Electron Image Film 4489 photographiert.

6. Herstellung des Antiserums

Für die Herstellung der Antiseren wurde Sekret von 840 Paragoniendrüsen von 7 Tage alten, isolierten Männchen verwendet. Es wurden zwei Hasenkaninchen nach folgendem Schema immunisiert:

<u>Tag</u>	<u>Arbeitsvorgang</u>	<u>Menge/Kaninchen</u>	<u>Bemerkung</u>
1	Probablutung	20 ml	Präimmunserum für Kontrollen
1	1. Injektion intracutan	Sekret von 60 Paragonien (=240 µg Protein) in 500 µl Insektenringer/0,9% NaCl l/l + 250 µl Freund Adjuvans incomplete + 250 µl Freund Adjuvans complete	
14	2. Injektion intracutan	Sekret von 120 Paragonien (=480 µg Protein) in 1 ml Insektenringer emulgiert mit 1 ml Freund Adjuvans incomplete	
32	3. Injektion in d. Ohrvene	Sekret von 240 Paragonien (=960 µg Protein) in 1 ml Insektenringer	
39	Probablutung	1 ml Blut	Prüfen d. Titters
42	Terminalblutung	ca. 80 ml Blut	

Das Serum wurde am folgenden Tag vom Blutkuchen getrennt und bis zur weiteren Verarbeitung in Portionen eingefroren.

7. Ouchterlony-Doppeldiffusionstest

Der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1967) wurde durchgeführt um einerseits den Titer der Seren zu bestimmen, andererseits um Paragonienhomogenate verschiedener *Drosophila*-Arten mit demjenigen von D. funebris in Bezug auf immunologische Verwandtschaft vergleichen zu können.

Als Trägermedium wurde 0,8% Special-Agar-Noble (Difco) in PBS (17,5 g NaCl/ 1,38 g NaH_2PO_4 / 1,78 g Na_2HPO_4 / H_2O bidest. ad 1000 ml / pH 7.05) verwendet. Je 15 ml Agarlösung wurden in Plastik-Petri-Schalen von 9 cm Durchmesser gegossen. Der Ouchterlony-Stempel wies folgende Dimensionen auf: Zentrales Loch 5 mm Durchmesser, 6 periphere Löcher in einem Abstand von 3,5 mm mit 4 mm Durchmesser. Die Diffusionszeit betrug 24-48 Stunden bei 4°C.

Zur Titerbestimmung wurde zentral 20 µl Antigen (=48 µg Paragonienproteine) gegen 20 µl Antiserum 1/1 bis 1/64 verdünnt mit PBS (peripher) getestet. Zur Bestimmung der Art-spezifität der Paragonienproteine wurden 7-tägige, isoliert gehaltene Männchen der Wildstämme D. funebris, D. subfunebris, D. melanogaster, D. nigromelanica, D. busckii und D. simulans verwendet.

8. Immunreplica-Elektrophorese nach Showe et al.

Die Immunreplica-Elektrophorese nach Showe et al. (1976) ist eine speziell für Polyacrylamidgelsysteme geeignete Art der Immunfixation, wobei ein Replica hergestellt wird, das die Präzipitate antigenischer Banden enthält. In einem ersten Schritt wurde ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) nach Lämmli (1970) hergestellt. Unmittelbar nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit einer 0,6%igen Agarose-Lösung (52°C), die Antiserum enthielt, überschichtet (Agarose BW / Ready). Die Schichtdicke betrug 0,1 mm. Die Serumkonzentration variierte zwischen 10 - 50 % (Volumen). Unmittelbar nach der Bildung von Präzipitationsbanden, spätestens aber

nach 4 Stunden, wurden die beiden Gele durch Schwenken in kalter (4°C) Salzlösung (PBS) voneinander getrennt. Ueberschüssiges Antiserum wurde mit PBS während 1-3 Tagen ausgewaschen. Anschliessend wurden beide Gele mit 0,1 % Coomassie brilliant blue R gefärbt nach Showe et al. (1976).

9. Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell

Antigenische Proteine lassen sich quantitativ mit der Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) sehr genau erfassen. Um einzelne Proteine zu verschiedenen Alterszeitpunkten, sowie zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation zu erfassen, wurde diese Methode angewendet. Grundsätzlich wurde nach den Angaben von Crowle (1973) verfahren.

Als Träger wurden doppeltbreite Objektträger verwendet (75 x 46 mm), die vorgängig in 0,2% wässrige Agarose-Lösung (60°C) getaucht und anschliessend bei 80°C getrocknet wurden. Die gebildete, hauchdünne Agarose-Schicht verhinderte ein Ablösen des Agarose-Gels vom Glas. Anschliessend wurde ein 0,5 mm dickes Agarose-Gel gegossen, wobei der obere, auf Plastik-Spacern liegende, Objektträger leicht mit Vakuumfett silikonisiert wurde, um ihn nach dem Gelieren des Gels wieder leicht entfernen zu können. Das Gel setzte sich wie folgt zusammen: Trägermedium: 1% Agarose (Typ BW/Ready) Puffer: Na-Barbital 0,025 M, pH 8,2 (= 3,96 g Na-Barbital, 770 ml H_2O bidest., 230 ml 0,025 n HCl). Eine Serumkonzentration von 4% (Volumen) wurde als optimal befunden.

Es wurde jeweils das Homogenat von 0,5 - 4 Paragonienpaaren in 1 - 8 μl Insektenringerlösung aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 10 V / cm Laufdistanz während 6 Stunden bei konstanter Spannung durchgeführt. Anschliessend wurde während 24 Stunden ungebundenes Antiserum mit PBS (2 mal gewechselt) ausgewaschen. Die Färbung erfolgte mit 0,1% Coomassie brilliant blue R in Methanol/Eisessig/Wasser (45/9/45 Volumenteile). Entfärbt wurde im gleichen

Lösungsmittel ohne Farbstoff. Die Gele wurden dann für 1 Stunde in eine 1,5%ige wässrige Glycerinlösung gelegt und anschliessend bei 40°C auf einem Heiztisch getrocknet. Photographien wurden auf Ilford Pan F-Film gemacht.

10. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Es wurde nach den Angaben von E. Rungger-Brändli (persönliche Mitteilung) verfahren. Paragonien oder Hoden wurden in einem Tropfen Insektenringerlösung seziiert. Damit die Präparate gut am Glas hafteten, liess man sie leicht "antrocknen". Darauf wurde das Präparat während 4 min in Methanol (100%/-20°C) und anschliessend während 2 min in Aceton (100%/-20°C) getaucht. Nach 5 min lufttrocknen wurde der erste Antikörper (s.u.) gekoppelt. Dafür war eine Inkubationszeit von 45 min bei 37°C nötig. Ueberschüssiges Antiserum wurde während 2 x 5 min mit PBS bei 37°C ausgewaschen. Die zweite Kopplung mit fluoreszenz-markiertem Antikörper (s.u.) erfolgte in gleicher Weise. Anschliessend wurde während 3 x 5 min mit PBS bei 37°C gewaschen. Der ganze Arbeitsvorgang wurde in einer Feuchtkammer ausgeführt. Die Präparate wurden mit einer Lösung aus Glycerol/PBS (9/1) pH 9 eingedeckt und mit käuflichem Nagellack versiegelt.

Als erster Antikörper diente Anti-Tubulin-Serum (gegen Schweinehirn-Tubulin) 10 mal verdünnt in PBS. Als zweiter Antikörper dienten FITC-gekoppelte Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobuline (BEHRING) in einer Konzentration von 1 : 20 (IG : PBS). Anti-Tubulin und FITC-gekoppelte Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobuline waren ein grosszügiges Geschenk von E. Rungger-Brändli (Hôpital Cantonal de Genève).

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Photomikroskop III angeschaut und auf Kodak Recording-Film photographiert.

III. RESULTATE

Die Paragonien von Drosophila funebris sind in ihrer Form und Grösse wesentlich vom Alter des Männchens und der Menge an Sekret abhängig. Jüngere Männchen weisen in der Regel sehr kleine und dünne Paragoniendrüsen auf, während ältere, isoliert gehaltene Männchen prall gefüllte, dicke Drüsen besitzen. Das Lumen wird von einem einschichtigen Epithel umgeben, welches auf einer Basallamina liegt. Zwischen dieser Basallamina und einer äusseren Lamina befinden sich Muskelzellen und Tracheolen.

Das Drüsenepithel besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen: Hauptzellen (90-95%) und Sekundärzellen (5-10%). Die weniger zahlreichen Sekundärzellen sind dispers angeordnet.

1. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege

1.1 Hauptzelle

Die Hauptzellen (H) weisen eine hochprismatische Form auf (Länge ca. 12 μm , Breite ca. 3-6 μm). Zellinteraktionen zwischen Hauptzellen unter sich, sowie zwischen Hauptzellen und Sekundärzellen, sind recht häufig (Abb. 1). Die apikale Zellregion besitzt einen lockeren Mikrovilli-Saum als Abgrenzung zum Lumen hin. Im übrigen sind die Hauptzellen wenig strukturiert.

1.1.1 Kern

Die Hauptzellen besitzen ausnahmslos zwei Zellkerne, die jedoch selten in der gleichen Schnittebene liegen. Die Zellkerne sind in diesem Stadium rundlich, wenig gelappt oder eingebuchtet und mässig elektronendicht. Sie besitzen einen stärker elektronendichten Nukleolus.

1.1.2 Zellorganelle

1.1.2.1 Mitochondrien

Die Mitochondrien (M) der Hauptzellen sind dispers verteilt. Sie werden ausnahmslos dem Crista-Typus zugeordnet. In der Form sind sie recht variabel und teilweise recht gross ($> 1 \mu\text{m}$). Die deutlich sichtbaren Cristae sind meist gerade. In seltenen Fällen wurden intramitochondriale Grana (Glycogen ?) gefunden.

1.1.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER) ist in diesem Stadium schwach ausgebildet und teilweise nur in Ansätzen erkennbar (Abb. 2). Zu diesem Zeitpunkt werden hingegen sehr viele freie Ribosomen in den Hauptzellen gefunden.

1.1.2.3 Golgi

Die Golgi-Apparate (G) sind in diesem Stadium nicht sehr zahlreich. Sie sind klein und zeigen typisch die inaktive Form. Eine Arealpräferenz konnte nicht festgestellt werden.

1.1.2.4 Vakuolen

Vakuolen (V) sind praktisch nicht vorhanden. Ansatzweise erkennt man weniger elektronendichte kleinere bis kleinste Gebilde, meist in der Nähe eines Golgi-Apparates, die als Vakuolen gedeutet werden könnten.

1.1.2.5 Besonderes

Am Rande der Hauptzellen bilden sich häufig zum extrazellulären Raum hin sogenannte "Phagozytose-Vakuolen" (Abb. 2). Es kann jedoch nicht gesagt werden, ob es sich um einen Endo- bzw. Exo-Zytose-Vorgang handelt. Der amorphe Inhalt ist meist schwach elektronendicht und keiner bekannten Struktur zuzuordnen. Diese charakteristischen, häufig vorkommenden "Gebilde" wurden in späteren Stadien nicht mehr beobachtet.

1.2 Sekundärzellen

Die Sekundärzellen (S) sind in der Form länglich-birnenförmig bis rundlich (Länge 10-12 μm , Breite ca. 10 μm). Sie unterscheiden sich von den Hauptzellen durch ein weniger elektronendichtes Zytoplasma (Abb. 4). Sekundärzellen sind in diesem Stadium besser entwickelt als vergleichbare Hauptzellen. Die Zellen besitzen einen relativ dichten Mikrovilli-Saum (Abb. 6).

1.2.1 Kern

Auch die Sekundärzellen sind wie die Hauptzellen binukleär. Die Kerne sind hier leicht gelappt und weisen eine rundliche Form auf. Der Nukleolus ist meist stark gelappt. Es wurde häufig beobachtet, dass die Kerne, im Gegensatz zu den Hauptzellen, an der Zellperipherie liegen.

1.2.2 Zellorganelle

1.2.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind dem Crista-Typus zuzuordnen; sie unterscheiden sich nicht von jenen der Hauptzellen. Grundsätzlich sind sie dispers verteilt. In einigen Fällen wurden sogenannte "clusters" gefunden (Abb. 3). Diese Anhäufungen von Mitochondrien findet man vorwiegend im basalen bis zentralen Zellabschnitt. "Clusters" wurden in allen untersuchten Stadien gefunden.

1.2.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das raue Endoplasmatische Retikulum der Sekundärzellen ist schwach ausgebildet, aber etwas besser als das vergleichbarer Hauptzellen. Es ist locker-kavernenförmig. Man findet, wie in den Hauptzellen noch viele freie Ribosomen.

1.2.2.3 Golgi

Der Golgi-Apparat der Sekundärzelle weicht morphologisch stark von dem der Hauptzellen ab: Er ist im wesentlichen kenntlich an einer Vielzahl kleiner Vesikel, die einen losen,

unregelmässigen Verband bilden. Es wird deshalb eher von einer Golgi-Region gesprochen (Abb. 10). In diesem Stadium ist die Golgi-Region nicht eindeutig identifizierbar, da die Golgi inaktiv und sehr klein sind. In Abb. 4 liegt der Golgi möglicherweise links neben der grauen Vakuole (nicht bezeichnet). Sekundärzellen weisen meist nur 2-3 solcher Golgi-Regionen auf, die in älteren Stadien (nach dem Schlüpfen) eindeutig identifizierbar sind.

1.2.2.4 Vakuolen

Die in Sekundärzellen durchwegs vorhandene sogenannte "graue Vakuole" (GV) ist gefüllt mit homogenem, mässig elektronendichtem Material. Die graue Vakuole ist typisch für Sekundärzellen und kommt nicht in Hauptzellen vor. Im vorliegenden Stadium ist sie relativ klein (Abb. 4). Ihre mögliche Funktion ist unklar. In späteren Stadien wächst sie etwa proportional zu den sogenannten "filamentous bodies" (FB). Diese werden als Hauptsynthese-Produkt der Sekundärzellen angesehen und werden ebenfalls nur dort gefunden. Sie bestehen aus einer elektronendichten grauen Matrix (Ma), die den Zentralteil von jedem "filamentous body" bildet. Um diese Matrix sind spulenartig Filamente von ca. 340 Å Durchmesser aufgewunden (Abb. 4, 5). Diese filamenthaltigen Körperchen sind von einer Membran umgeben. Die sehr elektronendichten Filamente scheinen kristallartig (hexagonal) angeordnet zu sein, ohne sich direkt zu berühren: zwischen den Filamenten ist äusserst schwach elektronendichtes Material eingelagert (Abb. 4). In diesem Stadium sind die "filamentous bodies" sehr klein (vergl. Abb. 1) und z.T. erst in Bildung begriffen. Viele kleinere Filamentkörperchen sind häufig dicht zusammengedrängt. Eine Arealpräferenz innerhalb der Zelle konnte nicht festgestellt werden.

Sekretgranulen (Sg) konnten häufig dicht am Mikrovillisaum gefunden werden. Sie sind maximal 0,2 µm gross und

stark elektronendicht (Abb. 6). Zusammensetzung und Funktion sind unklar. Sekretgranulen wurden nur in diesem Stadium und nur in Sekundärzellen gefunden.

1.2.2.5 Mikrotubuli

Mikrotubuli (Mt) wurden vornehmlich in Sekundärzellen, jedoch nur in diesem Stadium gefunden. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, unterscheiden sie sich im geringeren Durchmesser, sowie im schwächeren Kontrast deutlich von Filamenten der "filamentous bodies".

1.3 Lumen

Das Lumen (Lu) ist praktisch leer. Es ist demzufolge sehr klein. Gelegentlich findet man Filamente von 500 Å Durchmesser. Mässig elektronendichtes, flockiges Material ist dispers im Lumen verteilt (Abb. 6).

Eine Zusammenfassung dieser Befunde ist in Abb. I zeichnerisch dargestellt.

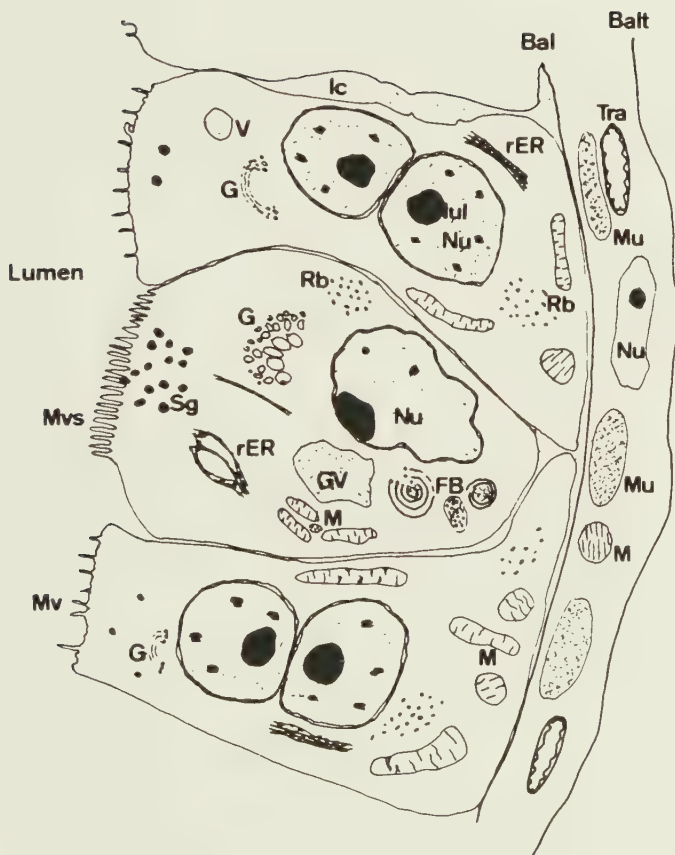


Abb. I: Zeichnerische Darstellung eines durchschnittlichen Paragonienausschnittes aus einer Paragoniendrüse von einer Puppe 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Erklärung im Text.

2. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse unmittelbar nach dem Schlüpfen der Fliege (0 Tage)

Paragoniendrüsen von unmittelbar geschlüpften Männchen sind wesentlich besser ausgebildet, als solche von Puppen 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen. Die Drüsenzellen sind syn-
thetisch aktiv, und das Lumen ist bereits mit Sekretions-
produkten angereichert.

2.1 Hauptzelle

Die Hauptzellen sind teilweise noch hochprismatisch, vor-
wiegend aber kubisch in der Form. Die apikale Zellregion
weist einen mehr oder weniger gut ausgeprägten Mikrovilli-
Saum auf.

2.1.1 Kerne

Die Zellkerne sind rundlich, nur selten leicht gelappt.
Sie unterscheiden sich kaum von Zellkernen des vorigen
Stadiums.

2.1.2 Zellorganelle

2.1.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind sehr zahlreich vorhanden. Sie weisen
vielfältige Formen und Grössen auf, gehören jedoch alle zum
Crista-Typus. Nicht selten wurden Mitochondrien mit Grana
gefunden. Die Verteilung der Mitochondrien zeigt eine grössere
Dichte an der Zellbasis, eine kleinere am apikalen Zellteil.

2.1.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das rauhe Endoplasmatisches Retikulum ist gut ausgebildet.
Es weist im apikalen Zellteil eine kavernöse Form auf - an
des Zellbasis ist es kavernös bis stapelförmig (Abb. 15).
Freie Ribosomen werden gelegentlich beobachtet, sind aber
lange nicht so häufig wie im vorigen Stadium.

2.1.2.3 Golgi

Golgi Apparate sind sehr häufig. Sie sind aktiv, d.h.

mächtig angeschwollen, mit enormen Vesikeln (Abb. 8, 10, 16). Diese Vesikel sind meist leer, manchmal aber auch gefüllt mit flockigem, mässig elektronendichtem Material.

2.1.2.4 Vakuolen

Vakuolen sind in diesem Stadium in extremer Häufigkeit und Varietät vorhanden (Abb. 7, 8, 9).

Riesenvakuolen mit einer Ausdehnung von bis zu 10 μm werden häufig in der Nähe des Mikrovilli-Saumes gefunden (Abb. 9). Ihr Inhalt ist in der Regel sehr heterogen: mässig elektronendichtes flockiges und faseriges Material bilden die Hauptbestandteile, kleinere stark elektronendichte Bestandteile sind seltener. Es wird aufgrund des heterogenen Inhalts angenommen, dass solche Riesenvakuolen durch Fusion mehrerer Vakuolen entstehen.

Flockige Vakuolen sind ebenfalls sehr häufig und werden vorwiegend in der apikalen Zellregion gefunden. Ihr Inhalt ist homogen flockig und mässig elektronendicht (Abb. 7). In der Grösse sind sie auf maximal 2 μm beschränkt.

Faserige Vakuolen treten in diesem Stadium regelmässig auf (Abb. 8). Ihr Inhalt ist faserig und mehr oder weniger bündelförmig angeordnet. Diese Faserbündel können schwach oder stark kondensiert sein; je nach dem ist die Vakuole mässig bis stark elektronendicht.

Heterogene Vakuolen sind kleine Vakuolen mit nicht genau bezeichnetem Inhalt. Sie können keinem der obigen Typen zugeordnet werden. In diesem Stadium sind heterogene Vakuolen häufig (Abb. 7, mitte rechts). Sie sind in der Regel kleiner als 1 μm und dispers in der Zelle verteilt.

Lysosomen werden nur in diesem Stadium und eher selten gefunden (Abb. 8).

Die extrem starke Vakuolentätigkeit in Verbindung mit geschwollenen Golgi-Apparaten wird als Beweis für eine synthe-

tisch aktive Phase interpretiert.

2.1.2.5 Mikrovilli

Mikrovilli sind etwa in gleichem Ausmass vorhanden wie im vorigen Stadium; der Mikrovilli-Saum ist nicht besonders dicht. Die Länge der Mikrovilli variiert zwischen 0,5 und 2 μm .

2.2 Sekundärzelle

Sekundärzellen sind kugelig bis birnenförmig, meist von Hauptzellen gelenkartig eingefasst. Bis zu 50% des Zellvolumens wird von "filamentous bodies" eingenommen (Abb. 10). Die Zellen sind synthetisch aktiv (s. u.).

2.2.1 Kern

Die Kerne der Sekundärzellen sind teilweise gelappt. In der Form sind sie recht unterschiedlich, jedoch selten rund. Die Kerne weisen eine sehr heterogene Kontrastierung auf.

2.2.2 Zellorganelle

2.2.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien werden vereinzelt überall in der Zelle gefunden. Die meisten Sekundärzellen besitzen jedoch eine bis zwei Mitochondrien-Regionen (Abb. 10), wo Mitochondrien gehäuft vorkommen. Diese Regionen liegen meistens im Zellzentrum.

2.2.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das rauhe Endoplasmatische Retikulum ist locker kavernös, niemals geschichtet oder stapelförmig. Die im Vergleich zu Hauptzellen deutlich lichtere Anordnung ist in Abb. 11 erkennbar.

2.2.2.3 Golgi

Die Golgi-Regionen sind aktiv: sie sind mächtig angeschwollen und die Vesikel sind teilweise mit mässig elektronendichtem Material gefüllt. Sekundärzellen besitzen

wesentlich weniger Golgi-Regionen als vergleichbare Hauptzellen. In der Regel liegen die Golgi-Regionen im Zellzentrum.

2.2.2.4 Vakuolen

Die Vakuolentätigkeit der Sekundärzellen beschränkt sich im wesentlichen auf die Produktion einer Unmenge von "filamentous bodies" (Abb. 10). Die filamentous bodies sind in diesem Stadium nur noch selten sehr regelmässig gebaut (Abb. 11), sondern lagern sich aneinander und fusionieren schliesslich. Dabei verhält sich die Kristallstruktur der einzelnen Filamentkörperchen recht konservativ, so dass diese auch im Fusionsprodukt noch deutlich erkennbar sind. Manchmal findet man Membranreste im Fusionsprodukt (Abb. 12).

Die graue Vakuole ist etwas grösser als im vorigen Stadium. Gelegentlich findet man innerhalb der grauen Vakuole stark elektronendichte Einlagerungen (Abb. 10).

Flockige Vakuolen werden gefunden, jedoch stets in unbedeutender Anzahl und Grösse.

2.2.2.5 Mikrovilli

Mikrovilli sind in ähnlichem Ausmass vorhanden, wie bei vergleichbaren Hauptzellen.

2.3 Lumen

Das Lumen ist in diesem Stadium schwach gefüllt: 500 Å - Filamente, Filamentbündel und flockiges Material sind die Hauptbestandteile (Abb. 14). Alle Bestandteile sind dispers im Lumen verteilt. Am Mikrovilli-Saum findet man häufig Reste ausgeschiedener Vakuolen (Abb. 7).

Eine Zusammenfassung dieser Befunde ist in Abb. II zeichnerisch dargestellt.



Abb. II: Zeichnerische Darstellung eines durchschnittlichen Paragonienausschnittes aus einer Paragoniendrüse einer frisch geschlüpften Fliege. Erklärung im Text.

3. Ultrastruktur einer durchschnittlichen Paragoniendrüse eines 7 Tage alten, virginellen Männchens

Paragoniendrüsen von 7-tägigen, isoliert gehaltenen Männchen sind prall mit Sekret gefüllt. Die Hauptzellen werden dadurch förmlich abgeplattet, während die Sekundärzellen ihre rundliche Form behalten.

3.1 Hauptzellen

Die Hauptzellen weisen eine längliche, abgeplattete Form auf (Höhe 7-5 μm , Breite 12-16 μm). Die Abplattung entsteht offensichtlich durch den extrem starken Füllungsgrad des Lumens (Abb. 22).

3.1.1 Kern

Der Kern ist durchwegs stark gelappt und länglich, die Kernmasse ist nicht homogen elektronendicht: es finden sich häufig elektronendichtere Heterochromatin-ähnliche Strukturen (Abb. 19).

3.1.2 Zellorganelle

3.1.2.1 Mitochondrien

Die Mitochondrien sind gegenüber früheren Stadien in Form, Typus und Verteilung gleich. Hie und da findet man Mitochondrien, die nicht intakt sind.

3.1.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das rauhe Endoplasmatische Retikulum ist nicht mehr kavernös, sondern meist in dichten Stapeln geschichtet (Abb. 17). Es verleiht der Zelle ein reliefartiges Bild.

3.1.2.3 Golgi

Golgi-Apparate sind dispers in der Zelle verteilt, aber nicht so häufig wie in jüngeren Stadien. Sie sind inaktiv, mit sehr kleinen leeren Vesikeln (Abb. 18).

3.1.2.4 Vakuolen

Vakuolen sind praktisch in jeder Hauptzelle vorhanden,

jedoch sind sie im allgemeinen klein. Filzig-faserige Vakuolen (Abb. 17) sind charakteristisch für dieses Stadium. Sie überschreiten selten eine Ausdehnung von 1,5 μm . Ihr Inhalt ist relativ elektronendicht und weist eine faserige, filzartig angeordnete Struktur auf.

"Schwarze" Vakuolen werden ebenfalls nur in diesem Stadium gefunden. Sie sind 0,5 - 1 μm klein und mit homogenem, extrem elektronendichtem Inhalt versehen (Abb. 17).

Die übrigen Vakuolen fehlen in diesem Stadium, mit Ausnahme der flockigen Vakuole, die jedoch nur in Einzelfällen beobachtet wurde und nicht als stadionspezifisch angesehen wird.

3.2.1.5 Mikrovilli

Mikrovilli sind spärlich vorhanden und teilweise mit kleinen blasenartigen Vesikeln versehen. Vergleiche Abb. 23.

3.2 Sekundärzelle

Die Sekundärzellen dieses Stadiums sind kugelig: Sie platten sich nicht ab, wie entsprechende Hauptzellen, da sie bis zu 70% mit Syntheseprodukten gefüllt sind (Filamentkörperchen, graue Vakuole). Im Zellverband fallen sie dadurch auf, dass ihr apikaler Zellteil meist ein gutes Stück ins Lumen hinausragt. Ihr Durchmesser beträgt etwa 8-10 μm .

3.2.1 Kern

Die Kerne der Sekundärzellen sind in der Regel sehr stark gelappt; eine bestimmte Form liegt nicht vor. Die nukleäre Matrix ist heterogen, mit einem grossen Anteil an Heterochromatin-ähnlichem Material.

3.2.2 Zellorganelle

3.2.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien unterscheiden sich in Gestalt und Typus nicht von denjenigen jüngerer Tiere. Die Verteilung kann

dispers sein, wobei aber auch Anhäufungen vorkommen. Auffallend oft wurden Mitochondrien beobachtet, deren Matrix sehr schwach elektronendicht ist (Abb. 21).

3.2.2.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das rauhe Endoplasmatische Retikulum ist vergleichbar mit dem vorigen Stadium (siehe unter 3.1.2.2)

3.2.2.3 Golgi

Golgi-Regionen sind wenig ausgeprägt, klein und inaktiv. Die Vesikel sind durchwegs leer.

3.2.2.4 Vakuolen

"Filamentous bodies" sind zahlreich vorhanden und können bis zu 70% des Zellvolumens einnehmen. Sie liegen nur noch ganz selten in Spulenform vor. Meist sind sie fusioniert und sehr häufig liegen sie in einer sogenannten "twist"-Form vor (Abb. 21). Die Filamente sind s-förmig verdreht und nur noch teilweise an der Matrix anliegend. Die Matrix wird zum Teil aus dem Filamentkörperchen ausgestossen, wobei die umgebende Membran gesprengt wird. Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, dass "twist"-förmige "filamentous bodies" keine erkennbare Membran aufweisen. Hier und da wurden nicht identifizierbare Membranreste in der Nähe solcher Filamentkörperchen gefunden (Abb. 21).

Die graue Vakuole ist in diesem Stadium ebenfalls vorhanden: Man findet entweder eine recht grosse graue Vakuole oder - seltener - zwei kleinere. Im übrigen wurden in den Sekundärzellen dieses Stadiums keine anderen Vakuolen gefunden.

3.3 Lumen

Das Lumen ist sehr stark mit Sekretionsprodukten gefüllt und, verglichen mit jüngeren Stadien, elektronendichter (Abb 18).

Flockige Proteine bilden den Hauptbestandteil, darin eingebettet sind Filamentbündel. Diese sind dispers im Lumen verteilt. 500 Å dicke Filamente durchkreuzen das Lumen in lockeren Scharen. Die Filamente innerhalb einer Schar verlaufen stets in der gleichen Richtung (Abb. 24,25). Verschiedene Scharen können sich kreuzen. Eine bevorzugte Richtung konnte nicht nachgewiesen werden.

Spiralige Filamentbündel (Abb. 20) kommen nur in diesem Stadium vor. Sie werden regelmässig in Filamentbündeln, die etwas lockerer geschichtet sind, gefunden. Es könnte sich hier um einen Umlagerungsvorgang handeln, wo einzelne Filamente aus Filamentbündeln zu grösseren regelmässigen Strukturen polymerisieren. Interessanterweise haben diese spiraligen Filamente (400-500 Å Durchmesser) einen ähnlichen Durchmesser wie 500 Å-Filamente.

Eine Zusammenfassung dieser Befunde ist in Abb. III zeichnerisch dargestellt.

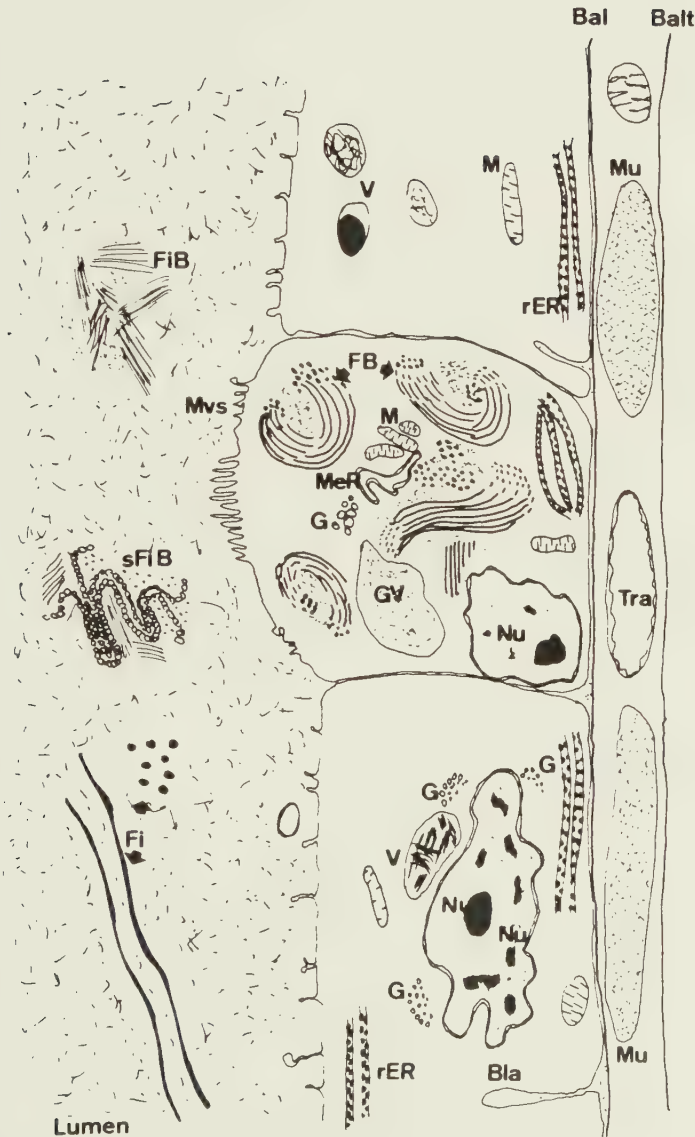


Abb. III: Zeichnerische Darstellung eines durchschnittlichen Paragoniendrüsenquerschnittes aus einer Paragoniendrüse einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege.
Erklärung im Text.

4. Ultrastruktur der Filamente

Folgende Makromoleküle wurden genauer untersucht: Die in den Sekundärzellen vorkommenden Filamente der "filamentous bodies" (1), die im Lumen gefundenen Filamente der Filamentbündel (2), die ebenfalls im Lumen vorkommenden spiraligen Filamente der Filamentbündel (3) und die 500 Å-Filamente (4), die das Lumen grossräumig durchqueren.

4.1 Filamente der "filamentous bodies"

Diese Filamente sind nur in Sekundärzellen anzutreffen (Abb. 26). Sie sind kristallartig (hexagonal) in den Filamentkörperchen angeordnet. Der minimale Abstand von Filament zu Filament beträgt ca. 200 Å, der Durchmesser der Filamente selbst ca. 300-340 Å. Die schwach elektronendichte Matrix zwischen den Filamenten wird mehr oder weniger regelmässig durchbrochen, so dass im Querschnitt ein Bild entsteht, als ob die Filamente über Seitenbrücken miteinander verbunden wären. (Vergleiche Abb. 13a). Dies konnte jedoch in keinem Längsschnitt bestätigt werden. Die Substruktur der Filamente (Abb. 26) besteht aus 10 peripheren, zirkulär angeordneten Untereinheiten von etwa 75 Å Durchmesser, die einen Hohlzylinder bilden. In der Mitte dieses Zylinders sind zwei kleinere - 40-50 Å Durchmesser aufweisende - Untereinheiten. Alle Untereinheiten sind unregelmässig kreisförmig im Querschnitt.

4.2 Gerade Filamente in Filamentbündeln

Filamente in Filamentbündeln sind nie kristallartig angeordnet. Sie sind mehr oder weniger locker zu Dutzenden gepackt und verlaufen meist in dieselbe Richtung. Viele solcher Packungen bilden ein Bündel (Abb. 14, 42). Gerade Filamente haben einen Durchmesser von ca. 120-140 Å.

4.3 Spiralige Filamente in Filamentbündeln

Die spiraligen Filamente haben einen Durchmesser von ca. $400 \text{ \AA}$. Sie wurden nur in Paragonien von 7-Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen gefunden. Filamentbündel, die nebst geraden Filamenten auch solche spiraligen Filamente enthalten, sind lockerer geschichtet als solche, die nur gerade Filamente enthalten. Die spiraligen Filamente werden als Polymerisationsprodukt aus geraden Filamenten ($120\text{--}140 \text{ \AA}$) angesehen, wobei der Polymerisationsvorgang als "unvollendet" betrachtet wird. Theoretische Berechnungen ergeben, dass 10 Filamente von $120\text{--}140 \text{ \AA}$ zirkulär zu einem Tubus angeordnet, ein Filament von ca. $500 \text{ \AA}$ Durchmesser ergeben würden. Dies entspricht etwa einem $500 \text{ \AA}$ -Lumenfilament.

4.4 Ultrastruktur des $500 \text{ \AA}$ -Filaments

Die ausschliesslich im Lumen gefundenen $500 \text{ \AA}$ -Filamente, auch Lumen-Filamente genannt, (Abb. 24, 25, 27-31) weisen im Querschnitt eine ähnliche Anordnung auf wie Filamente der Filamentkörperchen: Sie haben eine tubuläre Struktur, die aus mehreren - wahrscheinlich ebenfalls 10 - Untereinheiten besteht (Abb. 28). Zentral sind 1-2 Untereinheiten erkennbar (Abb. 27). Da die Lumen-Filamente nur äusserst selten im idealen Querschnitt getroffen werden, ist die Feststellung der Untereinheiten entsprechend schwierig. Die tubuläre Struktur ist gesichert (Abb. 31). Die Aussenwand der Filamente weist eine globuläre, helikale Struktur auf (Abb. 29).

5. Anti-Gen Lokalisierung auf dem Ultradünnschnitt

Mit einem polyspezifischen Antiserum, das gegen mehrere Sekretproteine Antikörper enthält (siehe unten) wurde versucht, die Antigene bzw. ihren Synthese- und/oder Speicherort in den Paragoniendrüsen 7-tägiger, isoliert gehaltener Männchen zu finden.

5.1 Hauptzellen

Die Hauptzellen aus Paragonien 7 Tage alter, isoliert gehaltener Männchen sind nicht synthetisch aktiv. In solchen Hauptzellen wurden keine Markierungen gefunden. Dies bedeutet offenbar, dass synthetisierte Produkte sofort ins Lumen sezerniert werden (Abb. 33).

5.2 Sekundärzellen

Die Sekundärzellen weisen in den "filamentous bodies" eine sehr starke Markierung auf (Abb. 36, 37 und Kontrolle mit Präimmunserum Abb. 35). Die Sekundärzellen speichern offenbar in den Filamentkörperchen ihre Syntheseprodukte, die je nach Bedarf abgegeben werden können. Der Sekretionsmechanismus ist aufgrund dieser Befunde allein nicht zu erklären (siehe unten).

5.3 Lumen

Das Lumen, das bereits aufgrund früherer Erkenntnisse als Speicherort diverser Syntheseprodukte angesehen wird, weist eine sehr starke Markierung auf: Markiert sind die flockigen Proteine. Die Filamentbündel hingegen sind nicht markiert (Abb. 33, 34).

Ob die 500 Å-Lumenfilamente markiert sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da diese von der sehr starken Markierung der flockigen Proteine überdeckt werden und demzufolge auf keinem Schnitt identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Uebersicht über die markierten Strukturen

Struktur	Markierung
Hauptzellen	-
Sekundärzellen:	
- "Filamentous bodies"	+++
- Rest	-
Lumen:	
- flockige Proteine	+++
- Filamentbündel	-
- 500 Å-Lumenfilamente	+ (?)

6. Kopulationsversuche

Paragoniendrüsen von 4-tägigen, isoliert gehaltenen Männchen wurden zu verschiedenen Zeiten nach einer erfolgten Kopulation untersucht. Die dabei zu erwartenden Veränderungen sollten ein Bild über den Zeitpunkt der Synthese und Sekretion, sowie über den Sekretionsmechanismus geben. Isoliert gehaltene Männchen im Alter von 4 Tagen kopulieren regelmässig mit gleichaltrigen, virginellen Weibchen.

6.1 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen nach 5 Minuten Kopulationsdauer

Die Kopulation dauert bei D. funebris etwa 12-17 Minuten. Trennt man die Tiere nach 5 min gewaltsam, so ist dies ungefähr nach einem Drittel der normalen Kopulationszeit. Paragoniendrüsen aus solchen Tieren weisen folgende Merkmale auf:

6.1.1 Hauptzelle

Hauptzellen verfügen über ein dicht gepacktes, kavernoöses bis stapelförmiges rER (Abb. 38). Golgi-Apparate sind durchwegs klein und inaktiv (Abb. 43). Vakuolen sind eher rar und wenn überhaupt vorhanden, dann sehr klein. Hingegen findet man im apikalen Zellteil, d.h. nahe an der Zell-Lumen-Grenze grössere "leere" Vakuolen (Abb. 38). Zwischen den einzelnen Hauptzellen befinden sich grössere Interzellularräume (Abb. 38, 39), die oft mit Zelldebris angereichert sind. Letztere sind nicht mehr näher identifizierbar.

6.1.2 Sekundärzellen

Sekundärzellen sind dicht mit "filamentous bodies" gepackt. Diese weisen in den meisten Fällen "twist"-Form auf (Abb. 45). Golgi-Regionen sind eher klein und werden als inaktiv angesehen (Abb. 44). Innerhalb der grauen Vakuole bilden sich eine oder mehrere "leere" Vakuolen. Diese wurden nie in Drüsen von virginellen Männchen gefunden, aber regelmässig in

solchen von Männchen, die kopuliert hatten (Abb. 45).

6.1.3 Lumen

Das Lumen ist auch nach einem Drittel der Kopulationszeit noch sehr gut gefüllt. Es unterscheidet sich nicht von vergleichbaren Kontrollen (siehe unten). Alle typischen Komponenten - flockige Proteine, Filamentbündel und 500 Å-Lumenfilamente - werden gefunden.

6.2 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 5 Minuten nach erfolgter Kopulation

Sollten in den Drüsenzellen während der Kopulation irgendwelche Veränderungen auftreten, so müssten sich diese im folgenden Stadium manifestieren.

6.2.1 Hauptzellen

Diese unterscheiden sich nicht vom vorhergehenden Stadium, ausser dass praktisch keine Vakuolen, insbesondere keine "leeren" Vakuolen, gefunden wurden. Golgi-Apparate sind inaktiv (Abb. 46).

6.2.2 Sekundärzellen

Sekundärzellen bilden oft einen sehr dichten Mikrovilli-Saum aus. Dies wird als Zeichen sekretorischer Aktivität interpretiert. Zugleich sind die Zellen synthetisch aktiv: Meist sind mächtige Golgi-Regionen anzutreffen. Häufiger als in anderen Stadien findet man in Auflösung begriffene Mitochondrien. Ebenfalls beachtenswert sind die relativ grossen Interzellularräume zwischen Hauptzellen und Sekundärzellen (Abb. 47).

6.2.3 Lumen

Das Lumen ist gesamthaft etwas weniger elektronendicht als im vorigen Stadium. Alle Komponenten sind jedoch vorhanden (Abb. 46).

6.3 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 1 Stunde nach der Kopulation

6.3.1 Hauptzellen

Diese sehen gegenüber dem vorherigen Stadium unverändert aus. Insbesondere finden sich weder Vakuolen noch aktive Golgi-Apparate.

6.3.2 Sekundärzellen

Diese sind überaus prall gefüllt mit Filamentkörperchen (bis zu 70% des Zellvolumens). Golgi-Regionen sind teilweise aktiv. Der Mikrovilli-Saum ist nicht mehr so dicht wie kurz nach der Kopulation. Vakuolen, abgesehen von der grauen Vakuole (und der darin eingeschlossenen "leeren" Vakuole) sind nicht vorhanden. Aufgrund dieser Merkmale werden Sekundärzellen dieses Stadiums als sekretorisch inaktiv angesehen (Abb. 48).

6.3.3 Lumen

Das Lumen weist die üblichen Komponenten vollständig auf und entspricht dem vorigen Stadium.

6.4 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen 3 Stunden nach der Kopulation

Solche Drüsen gleichen auf einen ersten Blick sehr stark Drüsen von frisch geschlüpften Männchen.

6.4.1 Hauptzellen

Hauptzellen sind synthetisch ausserordentlich aktiv. Golgi-Apparate sind geschwollen (jedoch nicht im selben Ausmass, wie solche von Paragoniendrüsen frisch geschlüpfter Fliegen), und die Vesikel sind teilweise mit heterogenem Material gefüllt. In jeder Zelle findet sich eine Vielzahl von Vakuolen. Am Rande der Hauptzellen, im Lumen, findet man Vakuolenreste und Vesikel, die aber nicht mehr eindeutig

einem Typus zugeordnet werden können (Abb. 51). Dieser Befund wird als Beweis für eine erhöhte Sekretionstätigkeit der Hauptzellen angesehen. Die am häufigsten vorkommenden Vakuolen sind: Faserige Vakuolen (Abb. 53), flockige Vakuolen und Vakuolen mit heterogenem, elektronendichtem Inhalt (Abb. 52). Das Vakuolenbild entspricht ziemlich genau demjenigen frisch geschlüpfter Fliegen. Erstmals wird ein stark ausgebildetes Basallabyrinth beobachtet.

6.4.2 Sekundärzellen

Sekundärzellen sind gegenüber dem vorigen Stadium unverändert.

6.4.3 Lumen

Das Lumen weist die üblichen Komponenten auf. Auf die sekretorische Aktivität der Hauptzellen lassen die oben erwähnten Vakuolenreste, die im Sekret in der Nähe von Hauptzellen gefunden werden, schliessen.

6.5 Paragoniendrüsen von 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen, die nie kopulierten (Kontrolle)

Das Bild solcher Paragoniendrüsen entspricht weitgehend demjenigen von Drüsen 7 Tage alter, isolierter Männchen. Die Zellen sind allgemein nicht so stark abgeplattet und das Lumen ist nicht so prallgefüllt, wie dasjenige von Drüsen von 7 Tage alten, isolierten Fliegen.

6.5.1 Hauptzellen

Das rER der Hauptzellen ist kavernenförmig, selten stapelförmig. Die Zelle hat inaktive Golgi-Apparate und praktisch keine Vakuolen. Ein Basallabyrinth ist nicht ausgebildet; dies geschieht offenbar erst nach der Kopulation (Abb. 55).

6.5.2 Sekundärzellen

Diese entsprechen ebenfalls dem 7 Tage-Typus. Die Interzellularräume sind gut ausgebildet. Es wird deshalb angenommen, dass Interzellularräume zwischen Sekundärzellen und Hauptzellen bereits vor der Kopulation gebildet werden, möglicherweise aufgrund des starken Füllungszustandes des Lumens. Die Sekundärzelle ist synthetisch inaktiv: Sie ist maximal gefüllt mit Filamentkörperchen. Die "leere" Vakuole innerhalb der grauen Vakuole ist noch nicht vorhanden und wird demzufolge erst nach der Kopulation gebildet.

6.5.3 Lumen

Das Lumen entspricht demjenigen eines 7 Tage alten, virginellen Männchens. Alle üblichen Komponenten sind vorhanden. Filamentbündel weisen hie und da eine sehr heterogene Packungsdichte auf (Abb. 54).

7. Serumtiter

Die beiden hergestellten Seren wiesen ein polyspezifisches Muster auf, d.h. im Ouchterlony Doppeldiffusionstest waren 5 Banden vorhanden. Der Titer des Serums war jeweils optimal bei einer Verdünnung von 1/4 bis 1/8 (Serum/PBS). Unter diesen Bedingungen waren die beiden stärksten Präzipitationslinien ohne Färbung erkennbar. In allen weiteren Experimenten wurden die beiden Seren gemischt im Verhältnis 1:1 verwendet. Es ist deshalb im Folgenden nur noch von einem, dem Anti-(funnebris)-Paragonien-Sekret-Serum die Rede. Dieses weist 2 stark und 3 schwach präzipitierende Fraktionen auf (unter den erwähnten Bedingungen). Dies wurde zusätzlich durch Immunelektrophorese nach Hirschfeld (1962) und durch Immun-replica-Elektrophorese nach Showe et al. (1976) bestätigt (siehe unter 9.).

8. Artspezifität der Paragonienproteine

Da Paragoniendrüsen von verschiedenen Drosophila-Arten ähnlich strukturierte Filamente aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass immunologisch verwandte oder identische Substanzen in anderen Drosophila-Arten als D. funnebris gefunden werden müssten.

D. funnebris weist, wie oben erwähnt, im Ouchterlony Doppeldiffusionstest 5 Präzipitationslinien auf, welche vom Zentrum zur Peripherie mit fu1 - fu5 bezeichnet wurden. Ob es sich dabei in allen Fällen um Proteine handelt, wurde nicht nachgewiesen. Zwei Ouchterlony Doppeldiffusionstests sind in Abb. 57 a, b abgebildet. In Tabelle 2 sind die Resultate aller untersuchten Arten zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass die relativ schwach ausgebildete Bande fu2 auch in den Arten D. subfunnebris, D. melanogaster, und D. nigromelanica vorkommt, hingegen bei D. busckii und D. simulans offensichtlich fehlt.



Abb. 57 a, b: Ouchterlony-Doppeldiffusionstest. Vergleich von Paragoniensekret von D. funebris gegen D. melanogaster (a) bzw. D. subfunebris (b).

a: Mitte: 20 μ l Anti-(funebris)-Paragoniensekret (1:2 verdünnt mit PBS). Peripher: Paragonienproteine (μ g) von: 1=D. funebris (8), 2=D. melanogaster (7), 3+5=D. funebris (24), 4+6=D. melanogaster (21).

b: Mitte: 20 μ l Anti-(funebris)-Paragoniensekret (1:2 verdünnt mit PBS). Peripher: Paragonienproteine (μ g) von: 1=D. funebris (22,5) 2=D. subfunebris (15) 3=D. funebris (7,5), 4=D. subfunebris (5), 5=D. funebris (15), 6=D. subfunebris (10). Erklärung im Text.

Tabelle 2: Ouchterlony Doppeldiffusionstest (Uebersicht)

<u>Paragoniensekret</u> (= Antigen) von	<u>Antiserum</u>	<u>Präzipitations-</u> <u>linien (n)</u>	<u>serologisch</u> <u>identisch</u>
			<u>n</u> <u>mit</u>
D. funebris	Anti-funebris-	5	5 ful-5 ¹⁾
D. subfunebris	Paragoniensekret	3	2 ful/fu2 ²⁾
D. melanogaster	"	2	1 fu2 ²⁾
D. nigromelanica	"	1	1 fu2
D. busckii	"	-	
D. simulans	"	-	

1) Die Präzipitationslinien sind vom Zentrum her zur Peripherie mit ful - fu5 nummeriert.

2) Die verbleibende Präzipitationslinie ist zu schwach um eindeutig zugeordnet werden zu können.

9. Identifikation immunologisch reaktiver Banden im Polyacrylamidgel

Trennt man ganze Paragoniendrüsen von 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen in einem 12,5% SDS-Gel nach Lämmli (1970) auf, so erhält man 46 Banden (Abb. 58, 59). Die 15 markantesten Banden wurden von der Anode zur Kathode mit 1 - 15 bezeichnet. Es handelt sich durchwegs um Banden, die sowohl im Sekret allein als auch in ganzen Paragoniendrüsen gefunden wurden (Vergleiche Abb. 58 a, b, 59 c). Das scheinbare Molekulargewicht der entsprechenden Proteine reicht von etwas grösser als MG 130 000 (Bande 15) bis kleiner als MG 12 400 (Bande 1).

Da verschiedene Autoren (Perotti, 1971 und Beaulaton und Perrin-Waldemer, 1975) die Filamente der "filamentous bodies" als Mikrotubuli betrachten, müsste man in einem entsprechenden SDS-Polyacrylamidgel Tubulin in Form einer starken Bande finden, die in der Region MG 56 000 liegen würde. Ein direkter Vergleich mit Tubulin aus Schweinehirn (Geschenk von E. Rungger-Brändli) zeigt, dass die entsprechende Bande keiner der Hauptbanden 1 - 15 zugeordnet werden kann. Vielmehr läuft Tubulin etwas weniger weit als Bande 11. Vergleiche Abb. 58 c.

Da Filamente in Filamentkörperchen mit Anti-Paragonien-Sekret im Ultradünnschnitt immunologisch identifiziert werden können (siehe unter 5.) - müsste, wenn es sich um Tubulin (bzw. Mikrotubuli) handeln würde, in der Region MG 56 000 (Tubulin) eine im Immunreplica präzipitierende Bande auftreten. Dies ist nicht der Fall. Ein entsprechendes Immunreplica ist in Abb. 59 gezeigt. Die präzipitierenden Banden liegen durchwegs im unteren Molekulargewichtsbereich. Vergleiche Tabelle 3.

Alle präzipitierenden Banden wurden im Sekret und in Paragonienhüllen gefunden. Aufgrund dieses Befundes handelt

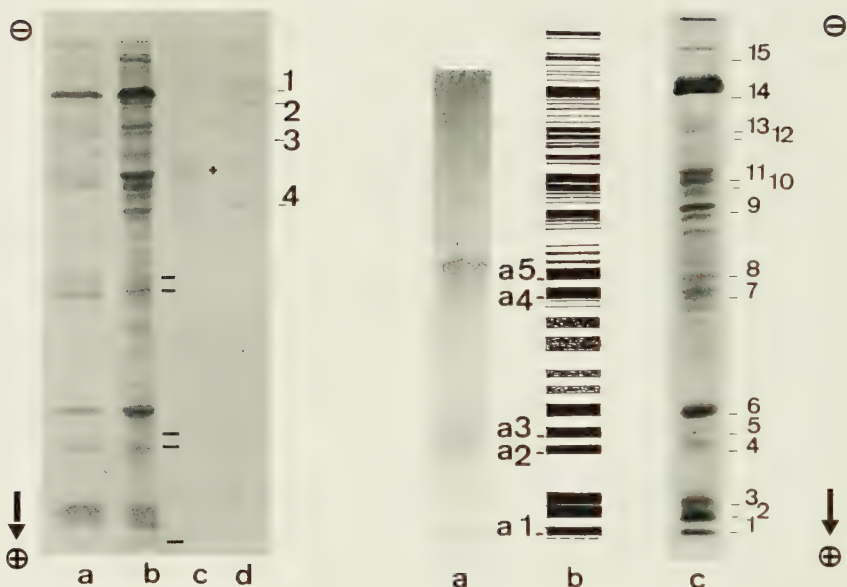


Abb. 58

Abb. 59

Abb. 58 12,5% SDS-Polyacrylamidgel: a Sekret von 10 Paragoniendrüssen. b Hüllen von 10 Paragoniendrüssen. Striche kennzeichnen antikörperbindende Fraktionen. c Tubulin aus Schweinehirn (Kreuz). d Molekulargewichtsmarker: 1 = Galactosidase 130 000, 2 = Phosphorylase B 94 000, 3 = Rinderserumalbumin 66 000, 4 = Ovalbumin 46 000. Erklärungen im Text.

Abb. 59 12,5% SDS-Polyacrylamidgel in Verbindung mit Immun-Replica. a Agarose-Replica a_1 - a_5 = präzipitierte Banden. b Schematische Darstellung des Bandenmusters wie in c abgebildet. Gestrichelt = Front. c 8 Paragoniendrüssen von 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen. 1-15 = Hauptbanden. Erklärung im Text.

es sich bei den immunologisch reaktiven Banden um Sekretionsprodukte.

Tabelle 3: Uebersicht über die immunologisch reaktiven Banden

Bande im 12,5% SDS-PAGE	Bande im Replica	Scheinbares MG ¹⁾
1	a 1	<12 400 (9 000 ^e)
4	a 2	16 000
5	a 3	17 000
7	a 4	33 500
8	a 5	37 000

1) Das scheinbare Molekulargewicht wurde mit einem MG-Standard (BSA 66 000, Ov 46 000, CA 29 000, CY 12 400) durch Koelektrophorese ermittelt. Siehe von Wyl (1974).

^e = Extrapolation

10. Fluoreszenzmarkierte Paragoniendrüsen

Um abzuklären, ob die Lumenfilamente im Sekret oder die "filamentous body"-Filamente in den Sekundärzellen Mikrotubuli-Natur aufweisen, wurden Paragoniendrüsen und Sekret mit Anti-Tubulin inkubiert. Ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper, der gegen den ersten (=Antitubulin) gerichtet ist, würde im positiven Fall die Stellen sichtbar machen, wo Anti-Tubulin bindet, z.B. an Mikrotubuli.

Abb. 60 c, d (=Kontrolle) zeigt eine schöne und regelmässige Markierung, der aus Hoden heraussezierten Spermien. Paragoniendrüsen und deren Sekret zeigen unter den gleichen Bedingungen Folgendes (vergleiche Abb. 60 a, b): 1. Sekretbestandteile werden nicht markiert. Die in Abb. 60 a (Phasenkontrast) dargestellten Bündel von Lumenfilamenten sind

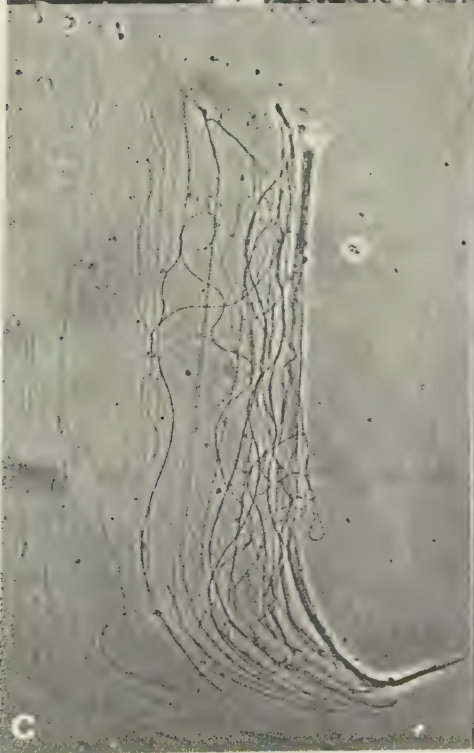
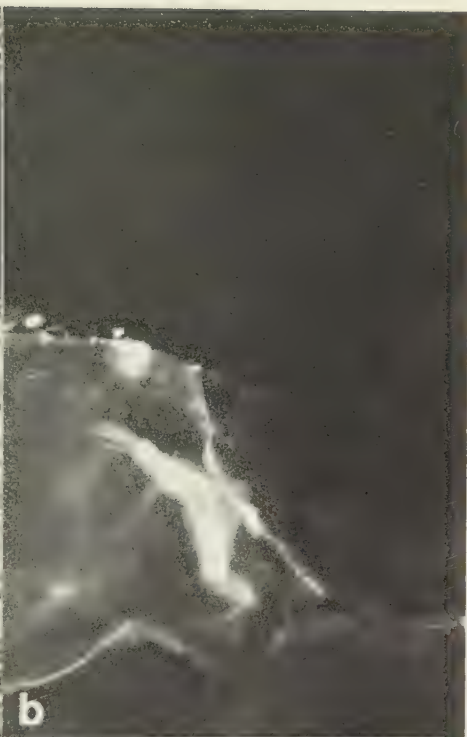
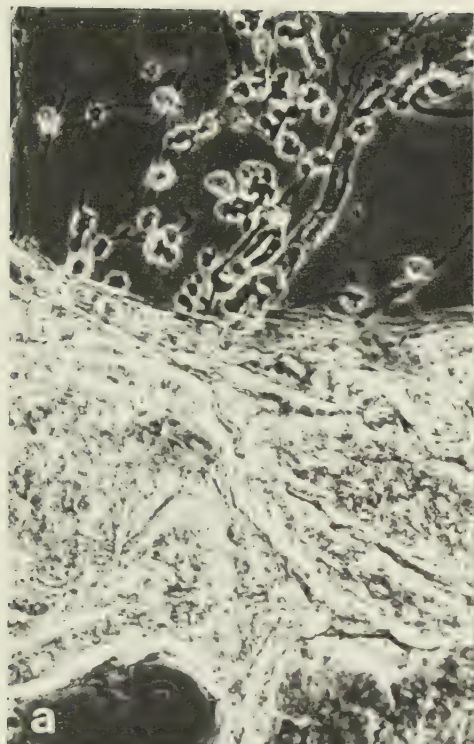
Abb. 60 a-d: Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung mit
Anti-Tubulin als erstem Antikörper.

a und b = Paragonien, Vergrößerung 153 x.

c und d = Spermien (=Kontrolle), Vergrößerung

240 x. a und c Aufnahmen in Phasenkontrast,

b und d korrespondierende Aufnahmen im Fluoreszenzlicht. Erklärungen im Text.



ebenso wie die zahlreichen, als Granulen erkennbaren Filamentbündel in Abb. 60 b (Fluoreszenzaufnahme) überhaupt nicht sichtbar, also nicht markiert. 2. Ganze Paragoniendrüsen weisen stets eine schwache unspezifische Markierung auf, die an der Grenze des photographisch Erfassbaren liegt. 3. Hie und da treten starke Markierungen auf, wie z.B. in Abb. 60 b, die aber völlig unspezifisch sind und keiner bekannten Struktur zugeordnet werden können. Es handelt sich hierbei offenbar um Artefakte, die auf ein ungenügendes Auswaschen des ersten Antikörpers zurückzuführen sind.

Aufgrund dieser Befunde wird angenommen, dass weder Sekretbestandteile noch "filamentous body"-Filamente aus Tubulin aufgebaut sind und demzufolge auch nicht als Mikrotubuli qualifiziert werden können.

11. Sekretionsleistung verschieden alter Paragonien

Bei der Identifikation der immunologisch reaktiven Banden im 12,5% SDS-Polyacrylamidgel konnte gezeigt werden, dass es sich bei den entsprechenden Proteinen um Sekretproteine handelt. Da diese Methode jedoch wenig sensitiv ist und kaum quantitative Aussagen zulässt, wurde zur Bestimmung der Sekretionsleistung verschieden alter Paragoniendrüsen auf die Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) zurückgegriffen. Die Auftrennung des Extrakts eines Paragonienpaares aus einem 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen wies 5 gut unterscheidbare Fraktionen auf, wobei 4 zur Anode und eine zur Kathode liefen. Vergleiche Abb. 61 i.

Es war von Interesse zu wissen, wann und welche Fraktionen synthetisiert, bzw. sezerniert werden und in welchem Ausmass. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Abb. 61 a-i dargestellt. Es zeigt sich Folgendes: 1. Erst Paragoniendrüsen von 2 - 3 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchen weisen alle 5 Fraktionen auf. Dies stimmt mit dem

Zeitpunkt der natürlichen Kopulationsbereitschaft überein.

2. Paragoniendrüsen von Fliegen, die jünger sind als 2 Tage, weisen ein unvollständiges Muster auf. 3. Paragoniendrüsen von Puppen 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege zeigen kein Präzipitationsmuster. 4. Das Muster ändert sich vom 3. - 7. Tag nur noch quantitativ. 5. Die einzelnen Fraktionen werden nicht simultan synthetisiert, bzw. sezerniert, sondern in der Reihenfolge:

Fraktion 1	Tag 0 nach dem Schlüpfen
Fraktion 5	Tag 1 " " "
Fraktion 2	Tag 1 " " "
Fraktion 4	Tag 1 " " "
Fraktion 3	Tag 2-3 " " "

6. Alle Fraktionen, ausser Fraktion 1, weisen mit fortschreitendem Alter eine mehr oder weniger lineare Zunahme auf, die am 6. Tag ihren Höhepunkt erreicht und sich am 7. Tag nicht mehr wesentlich ändert. Fraktion 1 verhält sich unregelmässig. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 62 wiedergegeben.

12. Sekretionsleistung von Paragoniendrüsen zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation

Aufgrund elektronenoptischer Resultate wird die Proteinsynthese etwa 3 Stunden nach der Kopulation deutlich erhöht. Es interessierte uns deshalb wie das Proteilmuster der Paragoniendrüsen zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation aussieht. Das Resultat eines solchen Versuches ist in Abb. 63 a-d dargestellt.

Auffallend ist das totale Fehlen der Bande 5, die zur Kathode laufen müsste, sowie die starke Reduktion der übrigen Banden. Zur Anode hin sind nur zwei Fraktionen deutlich erkennbar, wobei nicht gesagt werden kann, um welche es sich

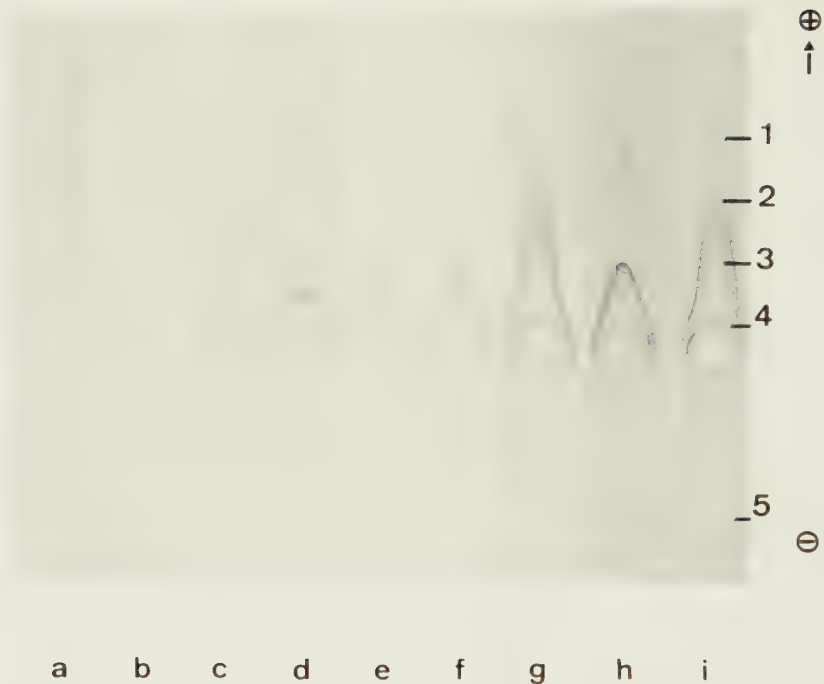


Abb. 61 Rocket-Immunelektrophorese von Paragoniendrüsen
verschieden alter Fliegen. Es wurde mengenmässig
je ein Paragonienpaar aufgetragen von:

a Puppe 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen des Männchens

b unmittelbar geschlüpfte Männchen

c 1 Tag altes, isoliert gehaltenes Männchen

d 2 Tage " " " "

e 3 Tage " " " "

f 4 Tage " " " "

g 5 Tage " " " "

h 6 Tage " " " "

i 7 Tage " " " "

Die Rockets sind mit 1-5 gekennzeichnet, wobei 1-4
zur Anode gehen und 5 zur Kathode.

Abb. 62 Graphische Darstellung der einzelnen Fraktionen in Bezug auf ihre Laufdistanz in der Rocket-Immunoelektrophorese in Altersabhängigkeit: ▨ = Fraktion 1 ▩ = Fraktion 2 ▪ = Fraktion 3 □ = Fraktion 4 ■ = Fraktion 5. Erklärung im Text.

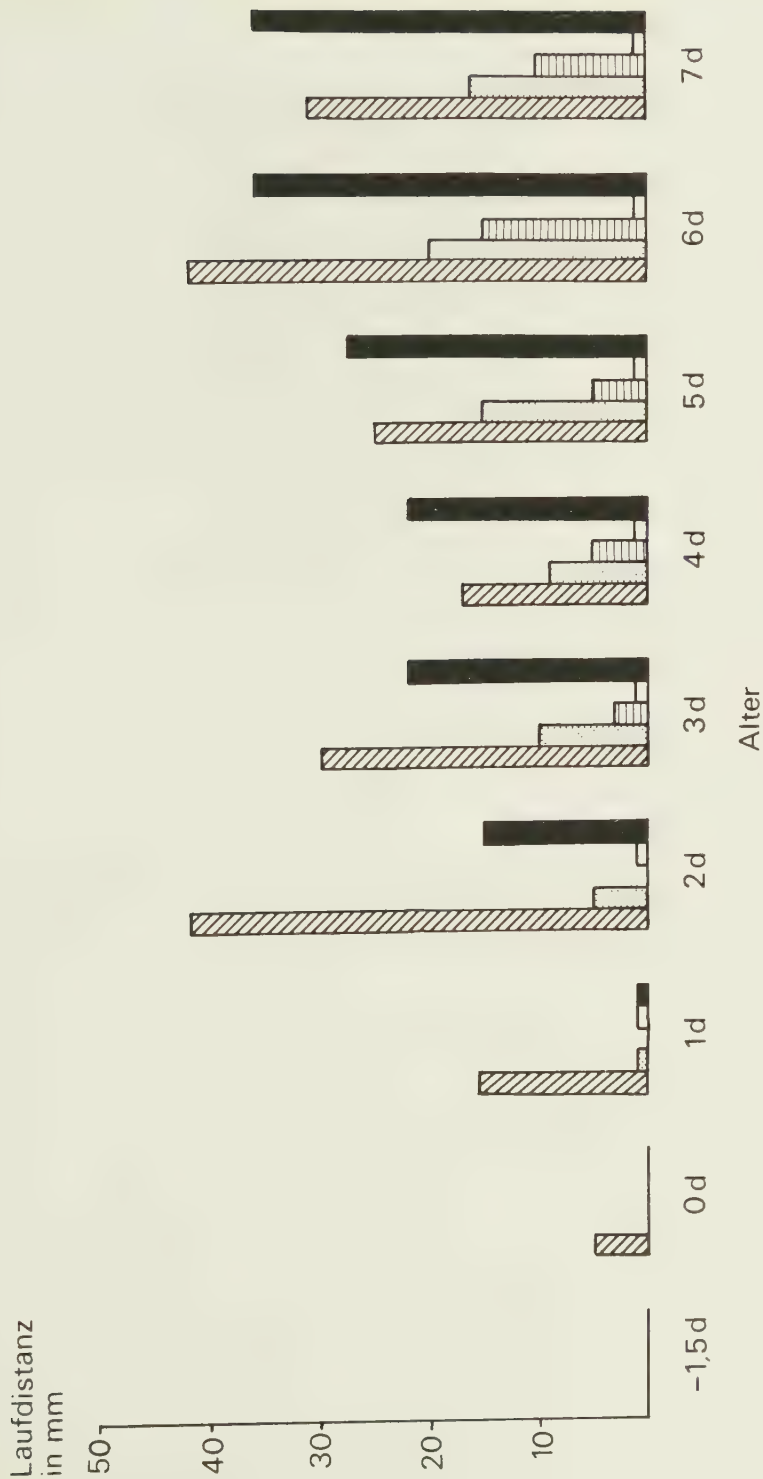




Abb. 63 Rocket-Immunelektrophorese von Paragoniendrüsen zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation. Es wurde mengenmässig je ein Paragonienpaar aufgetragen:

<u>a</u>	unmittelbar	nach	der	Kopulation
<u>b</u>	1 Stunde	"	"	"
<u>c</u>	3 Stunden	"	"	"
<u>d</u>	6 Stunden	"	"	"

handelt. Diese beiden Fraktionen sind unmittelbar nach der Kopulation und eine Stunde danach in unveränderter Konzentration vorhanden. Drei Stunden nach der Kopulation ist ein deutlicher Anstieg dieser beiden Fraktionen zu erkennen, der sich nach 6 Stunden nochmals wesentlich verstärkt. Die übrigen zwei Fraktionen liegen offenbar nur in sehr schwacher Konzentration vor, weshalb sie nahe am Auftragspunkt präzipitiert werden. Diese Tatsache verunmöglicht leider eine sichere Identifikation der einzelnen Banden. Das erhaltene Resultat stimmt mit den elektronenoptischen Befunden überein.

IV. DISKUSSION

1. Präparation

Um Fixierartefakte ausschliessen zu können, wurden mit jeder Präparation andere Gewebe als Paragoniendrüsen, z.B. Ductus ejaculatus, als Kontrolle mitpräpariert. Glutaraldehyd erwies sich als vorzüglicher Fixierer der Feinstruktur der Zellen. Artefakte wurden nicht beobachtet. Glutaraldehyd wurde auch deshalb gewählt, weil es solche intrazelluläre Systeme, wie Mikrotubuli, sER, Mitose-Spindeln und Pinozytose-Vesikel zuverlässiger konserviert als alle andern bekannten Fixierer (Hayat, 1970).

Bei Glycolmetacrylat-Einbettungen waren erhebliche Schwierigkeiten zu überwinden, weil das zu untersuchende Material noch mehr oder weniger biologisch aktiv sein sollte. Nur eine leichte und kurze Fixation der Präparate mit Glutaraldehyd konnte dies gewährleisten. Da zudem auf jegliche Osmierung und Kontrastierung verzichtet wurde, waren die entsprechenden Schnitte sehr kontrastarm. Der Auswaschprozess beim Entfernen des Harzes führte teilweise zu Wellen- und Faltenbildung und allgemein weniger gut interpretierbaren, aber qualitativ befriedigenden Bildern.

2. Paragoniendrüsen aus Puppen und Imagines

Paragoniendrüsen aus Puppen sind schwierig zu präparieren. Dies mag wohl der Grund sein, weshalb frühe Stadien bisher wenig Beachtung fanden. Im Gegensatz zu andern Drosophila-Arten, weist D. funebris schon im fortgeschrittenen Puppenstadium Paragoniendrüsen von einer gewissen Grösse auf, die sich entsprechend leichter präparieren lassen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Phase deckt die wesentlichen biologischen Abläufe im Leben eines D. fu-

nebris-Männchens ab: Bereits in der schlupffreien Puppe wird Sekret synthetisiert, beim Schlüpfen sind die Drüsenzellen voll ausdifferenziert und funktionstüchtig. Nach 4 - 7 Tagen ist die Paragoniendrüse mit Sekret gefüllt, welches bei einer Kopulation ins Weibchen überführt wird. Danach wird eine neue Proteinsynthese ausgelöst.

Interessant ist der Befund, dass bereits bei Puppen im Alter von 1 1/2 Tagen vor dem Schlüpfen im Drüsenlumen sekretorische Produkte gefunden werden, obwohl der überaus grösste Teil der Zellen noch nicht völlig ausdifferenziert ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Drüsenzellen sich nicht völlig synchron differenzieren und dass dieser Zeitpunkt den allerersten Beginn der Synthese-Phase darstellt.

Bezüglich der Zellzahl konnte im Beobachtungszeitraum keine Abnahme oder Zunahme festgestellt werden, sondern lediglich qualitative Veränderungen im Zellbild. Die von Bairati (1968) bei Sekundärzellen von Paragoniendrüsen von D. melanogaster beschriebenen Vakuolisierungsvorgänge und die damit einhergehende sukzessive Auflösung der Zelle haben wir bei D. funebris nie beobachtet. Eine Zellveränderung, wie die Abflachung der Hauptzellen mit zunehmendem Alter, ist lediglich auf den stärkeren Füllungszustand des Lumens zurückzuführen.

3. Kopulationsversuche

Von Wyl (1974) beobachtete bei D. melanogaster 4 Stunden nach der Kopulation einen deutlichen Anstieg der RNS- und Proteinsynthese in den Paragoniendrüsen. Bei D. funebris ist aufgrund von elektronenoptischen Befunden (geschwollene Golgi und Vakuolen) ein Anstieg der Syntheseleistung nach 3 Stunden feststellbar. Bairati (1968) und Perotti (1971) fanden bei Männchen, die mehrmals hintereinander kopuliert hatten, "filamentous bodies" im Drüsenlumen und degenerierte

Sekundärzellen, die z.T. in Auflösung begriffen waren. Dies wurde nach einer einmaligen Kopulation bei D. funebris nie gefunden. Die Sekundärzellen sind nach wie vor stark mit filamenthaltigen Granulen gefüllt. Möglicherweise handelt es sich bei der Degeneration der Sekundärzellen um eine extreme Erscheinung, die nur bei mehrmaligen, aufeinanderfolgenden Kopulationen vorkommt. Der Stimulus, den die Kopulation auslöst, scheint für die einzelnen Komponenten nicht spezifisch zu sein, denn es werden generell Vakuolen mit verschiedenstem Inhalt gefunden, d.h. das Vakuolenbild entspricht etwa demjenigen frisch geschlüpfter Fliegen.

Die "leeren" Vakuolen, die innerhalb der grauen Vakuole der Sekundärzelle regelmässig nach der Kopulation gefunden werden, lassen vermuten, dass das enthaltene Material während der Kopulation ins Lumen sezerniert wird. Drei Stunden nach erfolgter Kopulation sind diese "leeren" Vakuolen bereits wieder mit schwach elektronendichtem Material versehen. Für eine befriedigende Erklärung dieses Vorgangs sind weitere Untersuchungen nötig.

4. Sekretionsmechanismus

Grundsätzlich sind alle Drüsenepithelzellen der Paragonien zu sekretorischer Aktivität befähigt. Der Ausdruck "cellules sécrétrices" von Beaulaton und Perrin-Waldemer (1975), der sich nur auf die Sekundärzellen bezieht, ist demzufolge nicht richtig. Die Hauptzellen weisen ebenfalls einen zyklischen, merokrinen Sekretionsmechanismus auf. Die in diesen Zellen synthetisierten Produkte werden direkt ins Lumen abgegeben. Wie bereits erwähnt, fanden wir im Drüsenlumen der Puppen bereits einige wenige Syntheseprodukte, doch keine Vakuolen in den sekretorischen Zellen.

Bei den Sekundärzellen der Puppe und frisch geschlüpften Fliegen wurden ausser Sekretgranulen und kleinen Filament-

Körperchen keine nachweisbaren Speichervakuolen gefunden. Nach erfolgter Kopulation konnte gelegentlich ein extrem stark ausgeprägter Mikrovilli-Saum gefunden werden. Dies wird als Zeichen sekretorischer Aktivität gewertet. Aufgrund dieser Tatsache müsste ein merokriner Sekretionsmechanismus postuliert werden. Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten von Bairati (1968) und Perotti (1971), die für die Sekundärzellen einen holokrinen Sekretionsmechanismus postulieren. Zudem fanden wir bei D. funebris nie intakte "filamentous bodies" im Lumen, was bei einer holokrinen Sekretion zu erwarten wäre.

5. Ultrastruktur der Filamente

5.1 "Filamentous Bodies"

Filamenthaltige Körperchen wurden erstmals von Tandler et al. (1968) bei D. paulistorum beschrieben und als Viren interpretiert. Bairati (1968) identifizierte diese bei D. melanogaster als Sekretionsprodukt der Sekundärzellen. Das gleiche Ergebnis erhielt Perotti (1970, 1972) bei weiteren Untersuchungen an D. melanogaster, D. virilis, D. simulans, D. hydei und D. pseudoscura.

Die Filamente dieser Körperchen weisen je nach Art einen Durchmesser von 270-310 Å auf. Wiederum je nach Art variiert die Anordnung der einzelnen Filamente von streng hexagonal bis zu einer eher loserer Packung innerhalb eines Körperchens. Bei D. virilis unterscheidet Perotti (1971) aufgrund der Anordnung (Packungsdichte) und des unterschiedlichen Durchmessers einzelner Filamente 3 verschiedene Typen, die gelegentlich auch miteinander fusionieren können.

D. funebris besitzt grundsätzlich nur einen Typ von "filamentous bodies", der jedoch, wie gezeigt, in verschiedenen Konfigurationen vorkommen kann (Abb. 32 a - d).

Andererseits gleichen sich die Filamente aller bisher beschriebenen Arten auffällig in ihrer Grundstruktur: Sie stellen einen Hohlzylinder dar mit 10 peripheren und 1 - 2 zentralen Untereinheiten.

5.2 Lumenfilamente

Lumenfilamente unterscheiden sich von Filamenten aus Filamentkörperchen nur im Durchmesser ($500 \text{ \AA}$). Es wird angenommen, dass Lumenfilamente und "filamentous body"-Filamente funktionell gleich sind, wobei die ersten in Hauptzellen synthetisiert und im Lumen gespeichert werden, während die letzteren in Sekundärzellen gebildet und dort zurückbehalten werden. (Siehe auch: Immunologische Markierung 5.2).

Wie gezeigt werden konnte, sind Filamentbündel (aus 120 - 140 $\text{\AA}$ -Filamenten) offenbar Vorläufer, bzw. Untereinheiten, die unter geeigneten Bedingungen kondensieren, um Lumenfilamente zu bilden.

Die Rolle der flockigen Proteine ist unklar, muss jedoch bedeutend sein, da sie in recht grosser Menge im Lumen vorkommen. Möglicherweise sind sie ebenfalls am Aufbau der Lumenfilamente beteiligt.

Interessant ist die Tatsache, dass Lumenfilamente der verschiedensten Arten stets den gleichen Aufbau und sogar den gleichen Durchmesser ($500 \text{ \AA}$) aufweisen.

6. Indirekte Antigen-Markierung

Die immunologischen Befunde unterstützen die Theorie der Umwandlung von Filamenten aus Filamentbündeln in Lumenfilamente. Filamentbündel sind nicht markiert, hingegen wurden nie unmarkierte Lumenfilamente gefunden. Die sehr stark markierten flockigen Proteine scheinen an der Bildung der Lumenfilamente mitbeteiligt zu sein.

Die starke Markierung der Filamente der Filamentkörperchen beweist, dass im Lumen und in den Sekundärzellen immunologisch identisches Material ist, denn zur Herstellung des Antiserums diente Sekret. Möglich ist, dass (1) dieser Sekretanteil aus der merokrinen Sekretionsphase der Sekundärzellen stammt, dass (2) bei der Gewinnung des Sekretes sich "filamentous body"-Komponenten aus beschädigten Sekundärzellen lösten oder dass (3) die Sekundärzellen die gleichen Produkte synthetisieren, aber nicht ins Lumen sezernieren. Die letzte Hypothese wird eindeutig favorisiert, denn (1) zelluläre, nicht gelöste Bestandteile würden aus der Sekretfraktion abzentrifugiert. (Deshalb sind möglicherweise auch keine Filamentbündel markiert). (2) Die merokrine Sekretionsphase der Sekundärzellen ist kurz und nicht sehr intensiv, sodass in Anbetracht der geringen Zellzahl eine eher unwahrscheinliche Sekretionsleistung vorliegen müsste.

7. Spezielle Funktion der Sekundärzellen

Aufgrund des bisher Gesagten, zeigt sich eindeutig, dass die Sekundärzellen eine spezielle Funktion erfüllen. Da unter physiologischen Bedingungen nie ein holokriner Sekretionsmechanismus beobachtet wurde und die Zellen auch nach der Kopulation mit Produkten gefüllt sind, wird folgende Hypothese postuliert: Sekundärzellen bilden einen "zweiten Speicher". Das heisst, das Lumen bildet grundsätzlich den

ersten Produktspeicher. Die bei der Kopulation abgegebenen Produkte werden 3 - 4 Stunden nach der Kopulation durch die Hauptzellen wieder ergänzt. Nach mehrmaligen, aufeinanderfolgenden Kopulationen, d.h. unter Stress-Bedingungen, werden offenbar die Sekundärzellen aktiviert, möglicherweise durch einen holokrinen Sekretionsmechanismus.

Dies ist biologisch sinnvoll, denn eine erfolgreiche Begattung eines Weibchens ist nicht nur abhängig von der Anzahl erfolgreich transferierter Spermien, sondern in gleichem Masse von der beigefügten Menge Paragoniensekret (Lefèvre und Jonsson, 1962).

8. Die Natur von Lumen- und "filamentous body"-Filamenten

Die Ansicht Tandlers (1968), der die Lumen-, bzw. "filamentous body"-Filamente als RNS-enhaltende, Viren-ähnliche Strukturen betrachtete, wurde durch Perotti (1971) widerlegt, indem sie Glycolmetacrylat-Ultradünnschnitte mit Pronase oder Pepsin behandelte und so eine Verdauung der Filamente erhielt, was auf deren Protein-Natur hinweist. Andere Enzyme, vor allem RNase und DNase, bewirkten keine Veränderung der Filamentstrukturen.

Obwohl die Filamente Proteinnatur aufweisen, dürfte es sich bestimmt nicht um Mikrotubuli handeln, denn (1) cytoplasmatische Mikrotubuli sind im direkten Vergleich von geringerem Durchmesser und weisen andere Kontrast-Eigenschaften auf als Filamente der Filamentkörperchen. (2) Unter der Annahme, dass "filamentous body"-Filamente und Lumenfilamente biochemisch identisch sind, - was die meisten Autoren bejahen -, müssten Lumenfilamente mit Anti-Tubulin mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden können. Da dies nicht der Fall ist, dürfte es sich nicht um Mikrotubuli handeln.

Das Verhalten der Filamente weist allerdings einen ähnlichen Mechanismus auf, wie er bei Mikrotubuli auch vorkommt: Lumenfilamente kommen offenbar in polymerisierter und depolymerisierter Form vor. Dies konnte einerseits anhand von Bildern im Lumen direkt gezeigt werden (Kondensationsvorgang), andererseits wurden in Spermaflüssigkeit von D. melanogaster stets nur Lumenfilamente, aber nie Einheiten von Filamentbündeln gefunden (Bairati, 1966).

Der Zweck der Filamentbildung und Beimischung zum Sperma könnte nach Bairati (1966) (1) dem Spermientransfer dienen, (2) ein Reservematerial für die Spermien während dem Aufenthalt im weiblichen Rezeptakulum darstellen oder (3) die Filamente könnten Substanzen enthalten, welche das Eindringen des Spermiums ins Ei erleichtern.

Keine der obigen Hypothesen konnte direkt bestätigt werden, jedoch wird angenommen, dass die Lumenfilamente hauptsächlich eine lokomotorische Funktion ausüben, denn in allen Präparaten demonstrieren sie eine undulierende Bewegung und sind stets uniform ausgerichtet.

9. Artspezifität der Paragonienproteine

Verschiedene Drosophila-Arten wurden von Chen (1976) mittels Gelelektrophorese nach Davis (1964) in Bezug auf die Spezifität des Paragonienproteinmusters untersucht. Unter den gegebenen Bedingungen erwiesen sich die Proteinmuster als stark artspezifisch. Die aufgetrennten Hauptbanden sind in ihren elektrophoretischen Mobilitäten deutlich verschieden.

In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigen die mittels Ouchterlony-Doppeldiffusionstest erhaltenen Resultate, dass nur eine einzige Bande (fu2) bei insgesamt 4 der 6 untersuchten Arten vorkommt. Hierbei handelt es sich offenbar

um ein recht konservatives Protein. Interessant in diesem Zusammenhang wäre der Versuch, Ultradünnschnitte von D. nigromelanica-Paragoniendrüsen mit Anti-(funebri)-Paragoniensekret zu markieren. Da nur einer der 5 Antikörper mit D. nigromelanica-Paragoniensekret reagiert, könnte das entsprechende Antigen auf dem Dünnschnitt eindeutig identifiziert werden. Für ein genaueres Studium der Artspezifität von Paragonienproteinen wäre es allerdings unerlässlich, mit spezifischen Antiseren gegen einzelne Sekretfraktionen der Referenz-Art zu arbeiten.

10. Immunologische Identifikation einzelner Banden im Polyacrylamidgel

Zur Identifikation immunologisch reaktiver Banden wurde die Immunreplica-Elektrophorese nach Showe et al. (1976) angewendet. Es zeigte sich, dass ziemlich hohe Serumkonzentrationen nötig waren, um ausreichende Präzipitate im Replica zu erhalten. Dies ist offenbar auf die starke Interaktion von SDS und die Serumproteine zurückzuführen. Interessanterweise liegen alle Antikörper-bindenden Banden im unteren Molekulargewichtsbereich (Max. MG 37 000). Die Bestimmungsgenauigkeit der Molekulargewichte mittels SDS-Gelelektrophorese wird von Weber und Osborn (1969) mit $\pm 10\%$ angegeben für Proteine mit MG 100 000 - 15 000. Das bedeutet, dass zumindest die Banden a_2 - a_5 noch relativ genau bestimmt werden sollten.

Ueber die Natur der immunologisch aktiven Banden kann nur soviel gesagt werden, dass es sich in keinem Fall um Tubulin handelt. Dies geht aus Folgendem hervor:

1. Tubulin aus Schweinehirn liefert unter den vorliegenden Bedingungen eine Bande (vergl. Bryan, 1974), deren elektrophoretische Mobilität mit keiner der immunologisch aktiven Banden des Paragoniensekrets vergleichbar ist (Abb. 58).

2. "Filamentous body"-Filamente sind mit Anti-Paragoniensekret auf dem Ultradünnschnitt direkt markierbar, nicht aber die Tubulinbande im Gel. Die in Filamentkörperchen enthaltenen Filamente sind aus kleineren Einheiten aufgebaut. Ob sie aus einem oder mehreren Proteinen bestehen, kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen nicht gesagt werden.

11. Fluoreszenz-Markierung

Die Befunde der Fluoreszenz-Markierung sind ein weiterer Beweis, dass die Filamente in Filamentkörperchen sowie das Paragoniensekret keine Anti-Tubulin-bindenden Proteine enthalten. Background-Markierungen sind hie und da aufgetreten, jedoch stets unspezifisch. Der Grund dafür dürfte ungenügendes Auswaschen des ersten Antikörpers sein. Cytoplasmatische Mikrotubuli waren nie markiert in Paragonienzellen. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da nur gelegentlich in ganz jungen Stadien (in Puppen und unmittelbar geschlüpften Fliegen) Mikrotubuli im Cytoplasma beobachtet wurden. Offensichtlich stammen diese noch aus der letzten Zellteilung und depolymerisieren nachher sukzessive. Auf jeden Fall wurden in Paragoniendrüsen von 7 Tage alten Männchen nie cytoplasmatische Mikrotubuli im Elektronenmikroskop gefunden.

12. Sekretionsleistung und Entwicklungsalter

Die Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) zeigte das qualitative und quantitative Vorkommen einzelner immunologisch aktiver Sekretbestandteile. Da ganze Paragoniendrüsen verwendet wurden, kann nicht genau gesagt werden, was effektiv sezerniert und was in der Zelle gespeichert wurde. Dieser Aspekt wurde deshalb vernachlässigt,

weil die Hauptzellen ihr Sekret sofort ins Lumen abgeben, während die Sekundärzellen ihre Produkte akkumulieren. Demzufolge soll die Bildung von "filamentous bodies" in den Sekundärzellen ebenfalls als Sekretionsleistung bezeichnet werden.

Mit der empfindlichen Methode von Laurell (1966) war es möglich nachzuweisen, dass die einzelnen Proteine zur Zeit des Schlüpfens nicht gleichzeitig synthetisiert werden. Von besonderem Interesse hat sich Bande 5 erwiesen. Diese wandert bei pH 8.2 zur Kathode. Es sind nur wenige, stark basische Proteine bekannt, die sich ähnlich verhalten, z.B. Histone. Histon IV besitzt ein Molekulargewicht von 11 000 (Lehninger, 1979), was approximativ mit der Bande 1 im SDS-Gel übereinstimmen würde. Allerdings sprechen die extreme Zunahme der Fraktion 5 (Immunelektrophorese) im Alter und das Fehlen derselben nach der Kopulation nicht für ein Histon, dessen Funktion überdies in diesem Zusammenhang schwer erklärbar wäre. Weitere basische, niedermolekulare Substanzen, die ein ähnliches elektrophoretisches Verhalten aufweisen, sind Spermin und Spermidin. Diese beiden Substanzen kommen im menschlichen Samenplasma ebenfalls vor (Fair et al., 1972; Jänne et al., 1973). Eine DNS-stabilisierende Wirkung dieser beiden Substanzen ist bekannt. Erste Untersuchungen zeigen, dass Spermin und Spermidin im Paragoniensekret von D. melanogaster und D. funebris vorhanden sind (mündliche Mitteilung von P. Borner). Das quantitative Vorkommen und die Bedeutung der beiden Substanzen für D. melanogaster werden gegenwärtig untersucht.

Erst am 2. - 3. Tag nach dem Schlüpfen sind alle 5 (immunologisch aktiven) Sekretbestandteile vorhanden. Dies stimmt mit der natürlichen Kopulationsbereitschaft der Männchen überein, welche ungefähr am 2. Tag nach dem Schlüpfen einsetzt. Synthese und Sekretion laufen weiter bis zum

6. - 7. Tag nach dem Schlüpfen. Dann sind die Lumina der Paragoniendrüsen voll gefüllt, was auch elektronenoptisch bestätigt werden konnte.

13. Sekretionsleistung zu verschiedenen Zeiten nach der Kopulation

Von verschiedenen Autoren wurde die Kopulation als Stimulus für die Neusynthese von Paragoniensekret beschrieben (Bairati, 1968; von Wyl, 1974). Während die elektronenoptischen Befunde von Bairati (1968) auch für D. funebris bestätigt werden konnten, wurde mit der Rocket-Immunelektrophorese zwar ein allgemeiner Anstieg der antigenischen Protein-Fraktionen gefunden, jedoch werden die einzelnen Fraktionen nicht simultan synthetisiert. Nur 2 Fraktionen weisen einen deutlichen Anstieg auf. Fraktion 5, die eindeutig identifizierbar ist, tritt 6 Stunden nach der Kopulation noch nicht wieder auf. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Fraktion 5 ausserhalb der Paragonien synthetisiert und lediglich durch die Paragoniendrüsen akkumuliert wird. Ein ähnliches Modell wurde von Gillot und Friedel (1976) für Melanoplus sanguinipes vorgeschlagen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Ultrastruktur und Sekretproteine von Drosophila funebris wurden elektronenmikroskopisch und immunologisch untersucht. Um die funktionelle Differenzierung der sekretorischen Zellen verfolgen zu können, wurden Drüsen aus schlupfreifen Puppen und Adultmännchen im Alter von 0 bis 7 Tagen herausseziert und für die durchgeführte Analyse gebraucht.
2. In den Puppen, die 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen stehen, sind bereits Sekretprodukte im Lumen der Paragonien feststellbar. Zur Zeit des Schlüpfens sind alle Drüsenzellen ausdifferenziert. Die Sekretion erreicht ein Maximum in der ersten Woche des adulten Lebens, was mit der Fortpflanzungsaktivität der männlichen Fliegen korreliert ist.
3. Im Drüsenepithel kommen 2 verschiedene Zelltypen vor. Die Hauptzellen sind besonders zahlreich, und ihr Sekret wird unmittelbar nach der Synthese ins Lumen abgegeben, wo es auf dem elektronenoptischen Bild als flockiges Protein erkennbar ist. Die Sekundärzellen sind weniger zahlreich und enthalten im Cytoplasma die sogenannten Filamentkörperchen ("filamentous bodies"), die im Laufe der Entwicklung teilweise fusionieren. Im Lumen sind einzelne Filamente und Filamentbündel feststellbar. Lumenfilamente unterscheiden sich im Durchmesser von Filamenten der Filamentkörperchen, weisen jedoch die gleiche Grundstruktur, bestehend aus 2 zentralen und 10 peripheren Untereinheiten, auf. Aufgrund elektrophoretischer und immunologischer Befunde handelt es sich bei diesen Filamenten nicht um Mikrotubuli, wie bisher angenommen wurde.
4. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel wurden 5 immunologisch re-

aktive Proteinbanden festgestellt. Weitere immunologische Untersuchungen ergaben, dass nur eine einzige Proteinfraction bei 4 der 6 geprüften Drosophila-Arten gemeinsam ist. Dies erbrachte den Beweis für die Art-spezifität der Paragonienproteine.

5. In Uebereinstimmung mit dem früheren Befund stimuliert die Kopulation die Proteinsynthese der Paragoniendrüsen. Immunologisch konnte nachgewiesen werden, dass die Syntheserate für die einzelnen Sekretproteine verschieden ist.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Bairati, A. (1966) Filamentous structures in spermatic fluid of *Drosophila melanogaster* Meig. J. Microscopie 5, 265-268.
- Bairati, A. (1968) Structure and ultrastructure of the male reproductive system in *Drosophila melanogaster*. 2. The genital duct and accessory glands. Monit. Zool. Ital. 2, 105-182.
- Baumann, H., und Chen, P.S. (1973) Geschlechtsspezifische, ninhydrinpositive Substanzen in Adultmännchen von *Drosophila funebris*. Rev. Suisse Zool. 80, 685-690.
- Baumann, H. (1974) Die Paragoniensubstanzen von *Drosophila funebris*: Isolation, Struktur, Biosynthese und Wirkung. Dissertation Universität Zürich.
- Beaulaton, J. and Perrin-Waldemer, C. (1975) Contribution to the study of the paragonial secretion in *D. melanogaster*. - Ultrastructure and cytochemistry of microtubular granules. J. Microscopie Biol. Cell. 24, (1) 91-105.
- Bryan, J. (1974) Biochemical properties of microtubules. Fed. Proc. 33, 152-157.
- Chen, P.S., and Diem, C. (1961) A sex-specific ninhydrin-positive substance found in the paragonia of adult males of *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 7, 289-298.
- Chen, P.S., and Bühler, R. (1970) Paragonial substance (sex-peptide) and other free ninhydrin-positive components in male and female adults of *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 16, 615- 627.

- Chen, P.S. (1971) Biochemical aspects of insect development.
In: Wolsky (ed.): Monographs in Developmental Biology,
Vol. 3, Karger Basel.
- Chen, P.S. und Baumann, H. (1972) Untersuchungen über
das Vorkommen des Sexpeptides bei verschiedenen
Drosophila-Arten. Rev. Suisse Zool. 79, 333-341.
- Chen, P.S. (1976) Species-specific protein patterns in Drosophila paragonial glands. Experientia 32, 549-551.
- Chen, P.S. (1978) Protein synthesis in relation to cellular activation and deactivation. In: Rockstein, M. (ed.): Biochemistry and Insects, 145-200. Academic Press, N.Y.
- Crowle, A.J. (1973) Immunodiffusion (2nd edition). Academic Press, Inc. New York.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Sci. 121, 404-427.
- Fair, W.R., Clark, R.B., Wehner, N. (1972) A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. Fertil. and Steril. 23, 38-42.
- Fowler, G.L. (1973) Some aspects of the reproductive biology of Drosophila: Sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. Adv. Genet. 17, 293-260.
- Fox, A.S. (1956) Chromatographic differences between males and females in Drosophila melanogaster and role of X and Y chromosomes. Physiol. Zool. 29, 288-298.
- Fox, A.S., Mead, C.G. and Munyon, I.L. (1959) Sex peptide of Drosophila melanogaster. Science 129, 1489.

- Friedel, T. and Gillot, C. (1976) Male accessory gland substance of *Melanoplus sanguinipes*: An oviposition stimulant under the control of the Corpus allatum. *J. Insect Physiol.* 22, 489-495.
- Fuchs, M.S., Craig, G.B. and Hiss, E.A. (1968) The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. - I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life Sci.* 7, 835-839.
- Fuchs, M.S. and Hiss, E.A. (1970) The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 16, 913-939.
- Garcia-Bellido, A. (1964) Das Sekret der Paragonien als Stimulus der Fekundität bei Weibchen von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturforsch.* 19 b, 491-495.
- Gillot, C., Friedel, T. (1976) Development of accessory reproductive glands and its control by the Corpus allatum in adult male *Melanoplus sanguinipes*. *J. Insect Physiol.* 22, 365-372.
- Gros, D., Obrénovitch, A., Challice, C.E., Monsigny, M. and Schrével, J. (1977) Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of lectins on ultrathin glycol methacrylate sections. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 104-114.
- Hayat, M.A. (1970) Principles and Techniques of Electron Microscopy. New York: Van Nostrand Reinhold Co.
- Hirschfeld, J. (1960) Immunoelectrophoresis - Procedure and application of the study of group-specific variations in sera. *Science Tools* 7, 18-25.

- Jänne, J., Hölttä, E., Pirkko Haaranen and Elfving, K.
(1973) Polyamines and polyamine-metabolizing enzymes activities in human semen. Clin.Chim. Acta 48, 393-401.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 681-685.
- Laurell, C.B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Analyt. Biochem. 15, 45-52.
- Leahy, M.G. (1966) Egg deposition in *Drosophila melanogaster* increased by transplant of male paragonia. Dros. Inf. Serv. 41, 145-146.
- Leahy, M.G. and Lowe, M.L. (1967) Purification of the male factor increasing egg deposition in *Drosophila melanogaster*. Life Sci. 6, 151-156.
- Lefèvre, G. and Jonsson, U.B. (1962) Sperm transfer, storage displacement and utilisation in *Drosophila melanogaster*. Genetics 47, 1719-1736.
- Lefèvre, G. and Jonsson, U.B. (1964) Mutability of mature sperm following irradiation of virgin males and inseminated females. Dros. Inf. Serv. 39, 120.
- Lehninger, A.L. (1979) Biochemie (2. Aufl.) Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Merle, J. (1969) Nature des stimulations apportées par le mâle sur la physiologie des *Drosophila* femelles. Abstract 1. European *Drosophila* Res. Conf. The Hague, Netherlands.
- Millonig, G. (1966) Model experiments on fixation and dehydration. 6th Internat. Congr. El. Micr. (Kyoto) II, 21-22.

- Ouchterlony, O. (1967) In: Weir (ed.): Handbook of experimental immunology, p. 655. Academic Press, New York.
- Perotti, M.E. (1970) Filamentous structures in the male accessory glands of *Drosophila*. Septième Congrès International de Microscopie Electronique, Grenoble, Abstract p. 213.
- Perotti, M.E. (1971) Microtubules as components of *Drosophila* male paragonia secretion. An electron microscopic study, with enzymatic tests. J. Submicrosc. Cytol. 3, 255-282.
- Perotti, M.E. (1972) Microtubules as a secretion product. Boll. Zool. 39, 249-254.
- Reimer, L. und Pfefferkorn, G. (1973) Rasterelektronenmikroskopie. Springer Verlag, Berlin.
- Riemann, J.G., Moen, D.J., Thorson, B.J. (1967) Female monogamy and its control in house flies. J. Insect Physiol. 13, 407-418.
- Sato, T. (1967) A modified method for lead staining of thin sections. J. Electronmicroscopy 16, 133.
- Showe, M.K., Isobe, E., Onorato, L. (1976) Bacteriophage T₄ prehead proteinase. II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells. J. Mol. Biol. 107, 55-69.
- Spaur, R.C. and Moriarty, G.C. (1977) Improvements of glycol methacrylate. I. Its use as an embedding medium for electron microscopic studies. J. Histochem. Cytochem. 25, (3), 163-174.
- Spurr, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31.

- Tandler, B., Williamson, D.L. and Ehrman, L. (1968)
Unusual filamentous structures in the paragonia of male
Drosophila paulistorum. J. Cell Biol. 38, 329-386.
- von Wyl, E. (1974) Paragonienproteine von adulten *Drosophila melanogaster*-Männchen: Elektrophoretische Auftrennung und invitro-Synthese. Dissertation Universität Zürich.
- von Wyl, E. (1976) Paragonial proteins of *Drosophila melanogaster* adult male: electrophoretic separation and molecular weight estimation. Insect Biochem. 6, 193-199.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

VII. LISTE DER VERWENDETEN ABKUERZUNGEN

a) in Bildern

Bal	Basallamina
Balt	Basallamina von Muskel- und Tracheolenzellen
Bla	Basallabyrinth
F	Filamente in Filamentkörperchen
FB	"filamentous bodies", Filamentkörperchen, filamenthaltige Körperchen
Fi	Lumenfilamente (500 Å)
FiB	Filamentbündel
fP	flockige Proteine
G	Golgi
GV	graue Vakuole
H	Hauptzelle
Ic	Interzellularraum
Lu	Lumen
Ly	Lysosom
M	Mitochondrium
Ma	Matrix
Me	Membran
MeR	Membranrest
Mt	Mikrotubulus
Mu	Muskelzelle
Mv	Mikrovilli
Mvs	Mikrovilli-Saum
Nu	Nucleus, Kern
Nul	Nucleolus
Rb	Ribosomen
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
S	Sekundärzelle
sFiB	spiralige Filamentbündel
Tra	Tracheole
V	Vakuole

b) Abkürzungen im Text

BSA	Rinderserumalbumin
CA	Carbanhydrase
CY	Cytochrom C
FITC	Fluoreszein-iso-thio-cyanat
IG	Immunglobuline
MG	Molekulargewicht
Ov	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	phosphate buffered saline (= 17,5 g NaCl /1,38 g NaH ₂ PO ₄ /1,78 g Na ₂ HPO ₄ /pH 7.05)
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate (Natriumsalz)
sER	smooth endoplasmatic reticulum

Abb. 1 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. In der Uebersicht erkennt man deutlich die wenig strukturierten Hauptzellen (H). Die Sekundärzelle (S) zeigt Ansätze zur Bildung eines Filamentkörperchens (Pfeile).

Abb. 2 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Der Schnitt durch die Hauptzelle zeigt die für dieses Stadium spezifischen Exo- bzw. Endocytose-Vakuolen (*). Das zelluläre Membransystem ist wenig ausgeprägt: Viele freie Ribosomen, wenig rER und schwach ausgebildete Golgi-Apparate sind charakteristisch.

Abb. 3 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Die Matrix der Sekundärzellen weist ein etwas besser ausgebildetes ER auf, als die vergleichbarer Hauptzellen. Es sind jedoch noch viele ungebundene Ribosomen vorhanden. Auffallend häufig sind Mitochondrien verschiedenster Ausprägung.

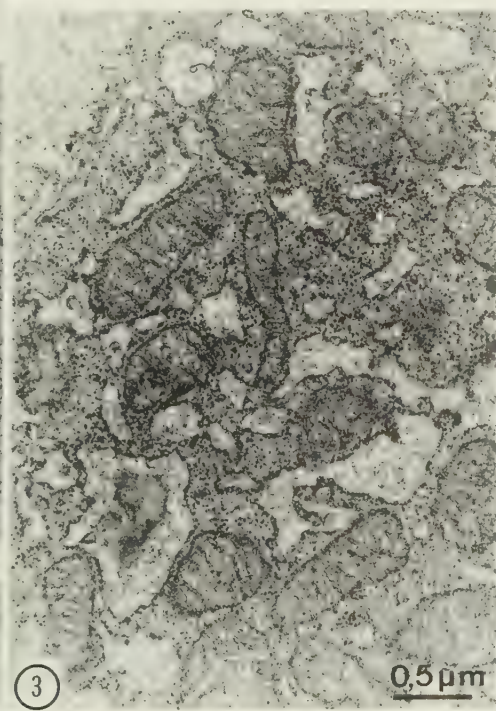
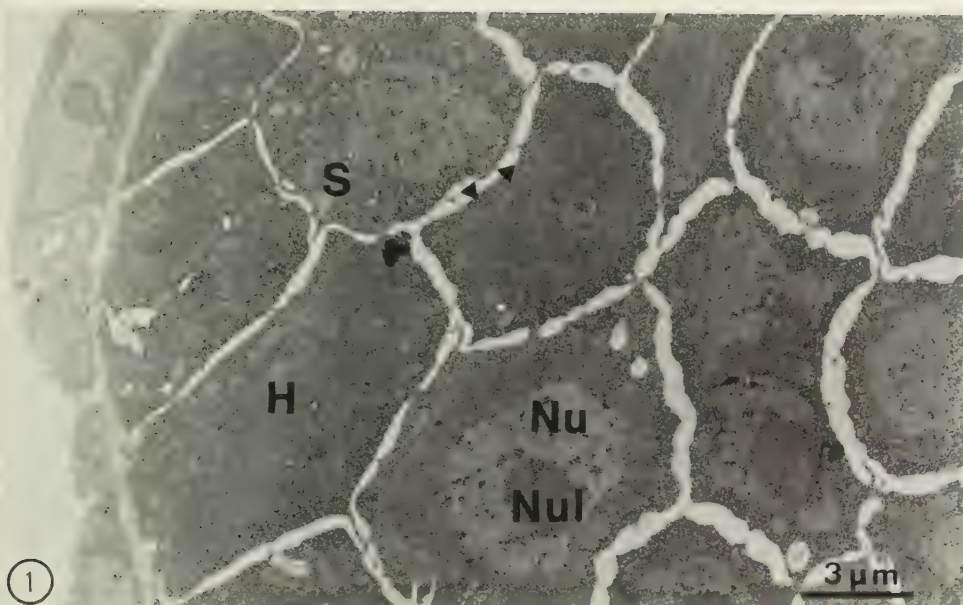
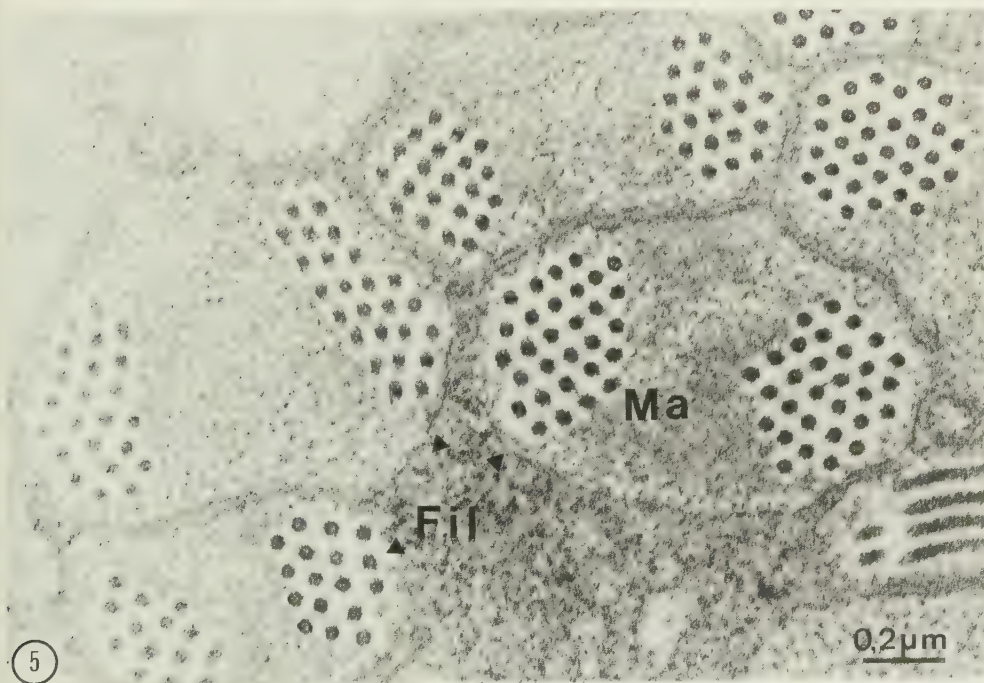
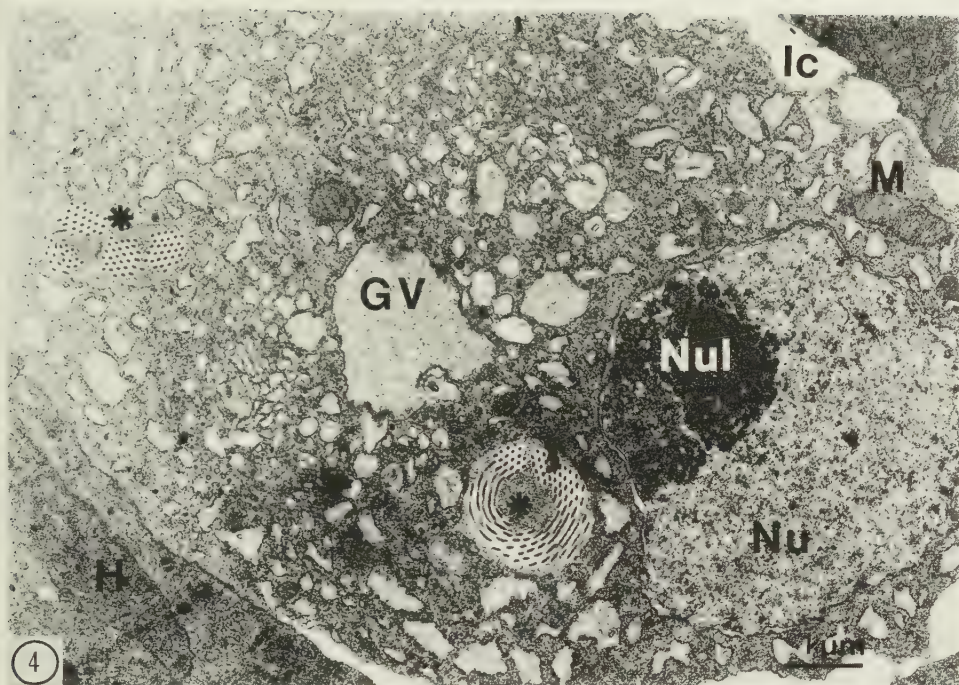


Abb. 4 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Typische Sekundärzelle. Der Kern ist mässig gelappt. Praktisch die ganze Zelle ist mit kavernenförmigem rER ausgefüllt. An verschiedenen Orten bilden sich "filamentous bodies" (Sterne). Recht gut ausgebildet ist die für diesen Zelltyp charakteristische "graue" Vakuole, die mit mässig elektronendichtem Material gefüllt ist.

Abb. 5 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Ausschnitt aus einer Sekundärzelle. Eine Aggregation von Filamentkörperchen wurde quer zum Filamentverlauf getroffen. Um eine mässig elektronendichte Matrix sind die Filamente spulenartig aufgewunden. Die Filamente sind kristallartig (hexagonal) angeordnet. Zwischen den einzelnen Filamenten ist schwach elektronendichtes Material eingelagert.



- Abb. 6 Paragonium 1 1/2 Tage vor dem Schlüpfen der Fliege. Ausschnitt aus einer Sekundärzelle. Sekretgranulen in der Nähe des Mikrovilli-Saumes sind typisch für dieses Stadium. Das Lumen ist klein. Filamente im Lumen weisen einen deutlich grösseren Durchmesser auf als solche in Filamentkörperchen.
- Abb. 7 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Ausschnitt aus einer Hauptzelle. Auffallend und sehr charakteristisch sind die Vakuolen, die teils flockigen, teils dichten oder heterogenen Inhalt aufweisen. Das rER ist stark kavernös.
- Abb. 8 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Ausschnitt aus dem basalen Teil einer Hauptzelle. Der mächtig angeschwollene Golgi-Apparat (G) und diverse Vakuolen kennzeichnen dieses synthetisch aktive Stadium. Besonders häufig sind Vakuolen mit faserigem Inhalt, der meist spiralförmig angeordnet ist, sowie Lysosomen mit undefinierbarem Inhalt. Beachte die Anordnung der Vakuolen entlang einer unterbrochenen Membran.
- Abb. 9 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Ausschnitt aus dem apikalen Teil einer Hauptzelle. In diesem Stadium häufig auftretende Riesenvakuole, die aufgrund des heterogenen Inhalts als Fusionsprodukt mehrerer kleiner Vakuolen angesehen wird. Der Hauptbestandteil ist stets flockiges, mässig elektronendichtes Material.

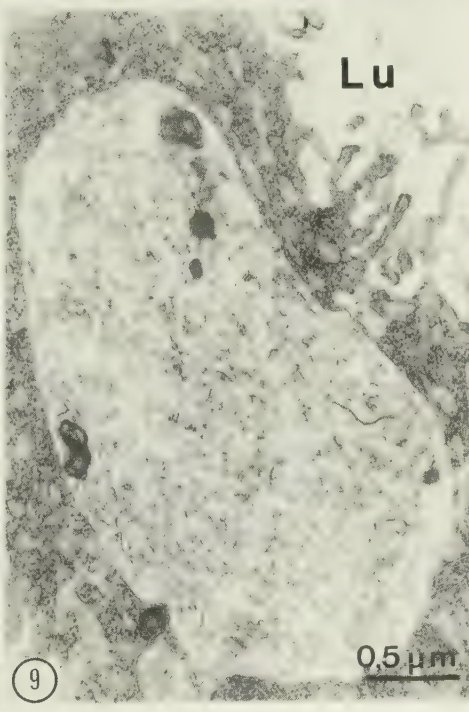
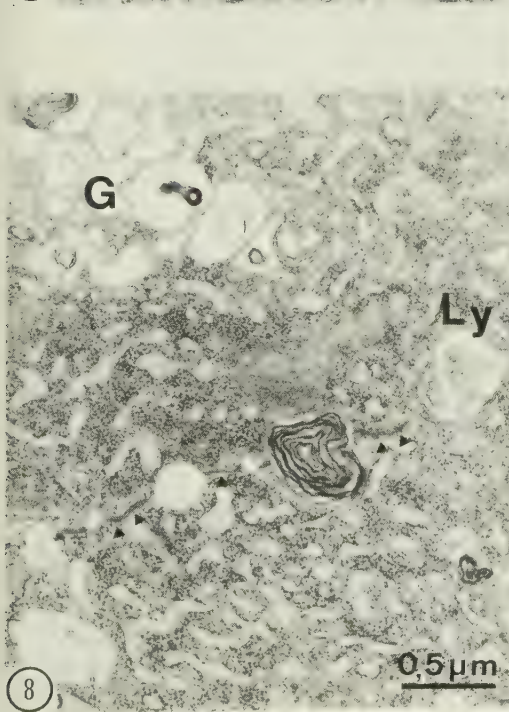
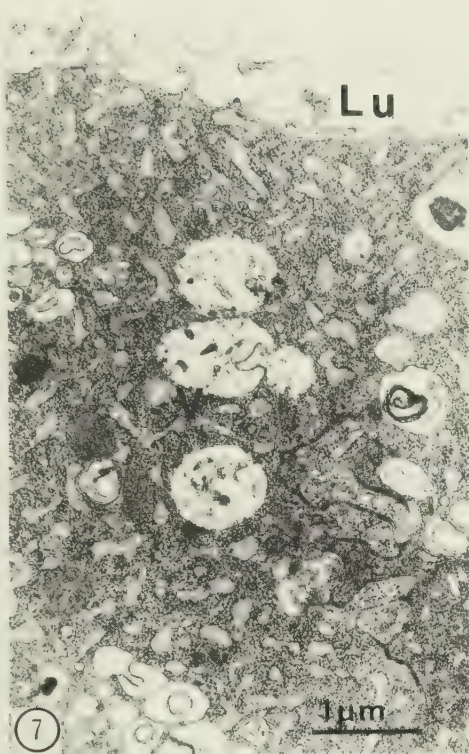
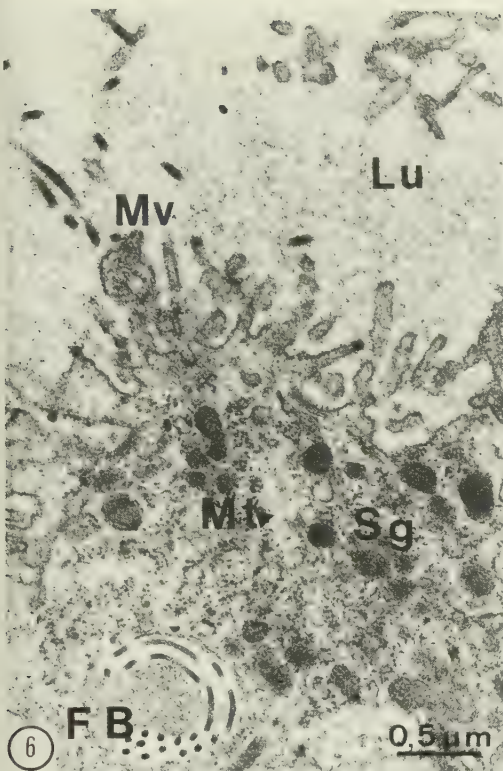


Abb. 10 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Uebersicht: Zwischen zwei Hauptzellen eingebettet liegt eine Sekundärzelle. - Die Golgi-Apparate der Hauptzellen sind mächtig angeschwollen. Die Sekundärzelle zeigt einen gelappten Nukleus, eine Golgi- und eine Mitochondrien-Region, eine "graue" Vakuole und reife "filamentous bodies", die einen grossen Teil des Zellvolumens ausfüllen. Die cytoplasmatische Matrix der Sekundärzelle ist stets weniger elektronendicht, als jene vergleichbarer Hauptzellen. Die mit einem Stern bezeichnete Region ist in Abb. 12 dargestellt.

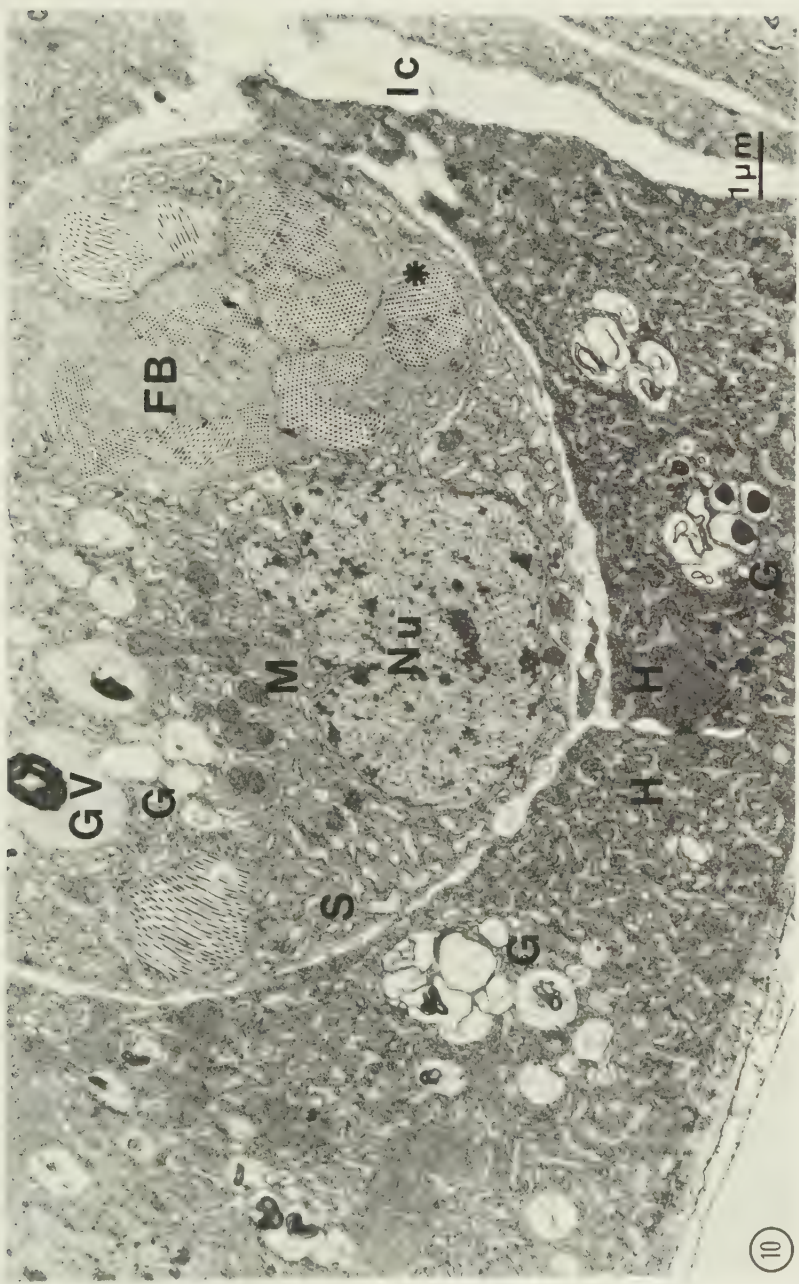


Abb. 11 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Ausschnitt aus einer Sekundärzelle. Die weniger elektronendichte Zellmatrix der Sekundärzelle hebt sich ab von den begrenzenden elektronendichteren Hauptzellen. Der abgebildete "filamentous body" ist schräg zum Filamentverlauf getroffen.

Abb. 12 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Ausschnitt aus Abb. 10. Ein reifes Filamentkörperchen ist quer zum Filament-Verlauf geschnitten. Es zeigt sich deutlich, dass keine einheitlich kristallartige Anordnung vorliegt, sondern das Fusionsprodukt von drei filamenthaltigen Körperchen. Membranreste sind noch erkennbar (Pfeil).

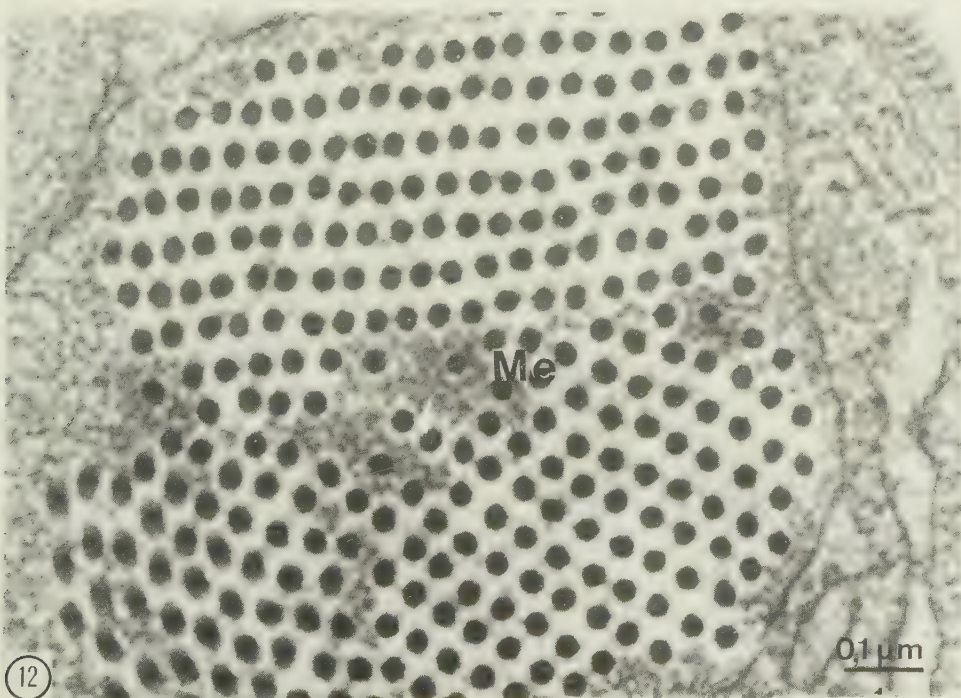
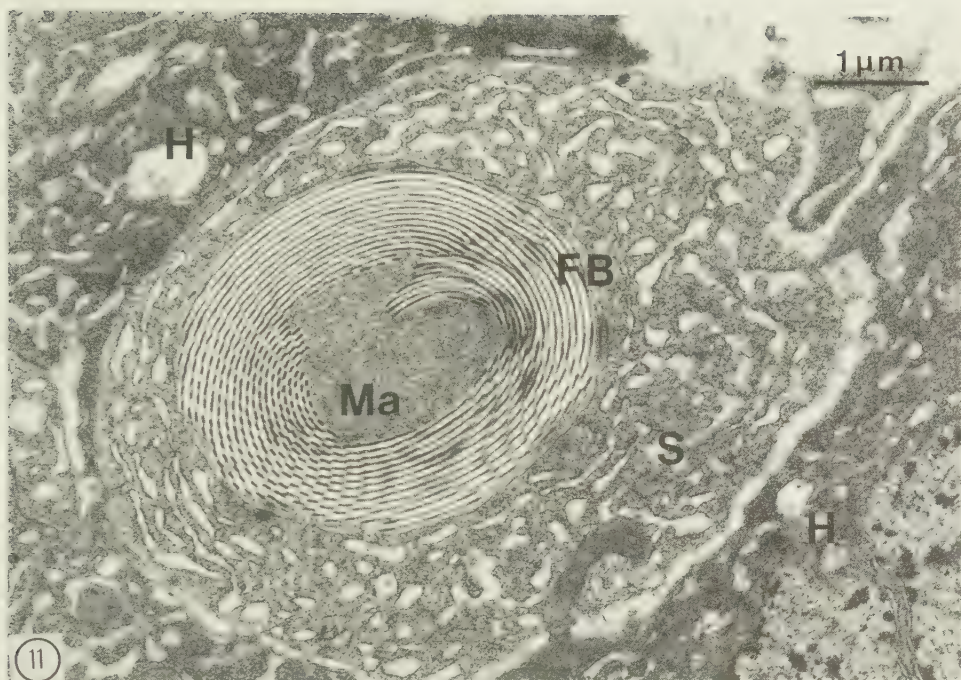


Abb. 13 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Struktur eines quer getroffenen "filamentous body". Gut erkenntlich sind "Querverbindungen" einzelner Filamente untereinander (siehe Text).

Inset: stärker vergrößert (Balken entspricht 0,02 μm)

Abb. 14 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Lumenausschnitt. Die Untereinheiten der Filamentbündel sind wesentlich kleiner (120-140 Å) als quer geschnittene Lumenfilamente (500 Å) (Pfeile).

Abb. 15 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Hauptzelle. rER bei starker Vergrößerung. Der Ausschnitt stammt aus dem basalen Zellteil, wo das rER seine später typische, stapelförmige Struktur bereits aufweist.

Abb. 16 Paragonium einer unmittelbar geschlüpften Fliege. Stark angeschwollener Golgi-Apparat einer Hauptzelle.

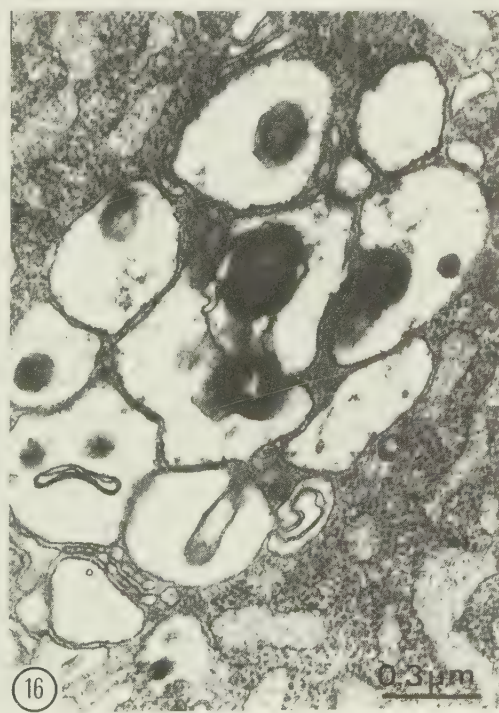
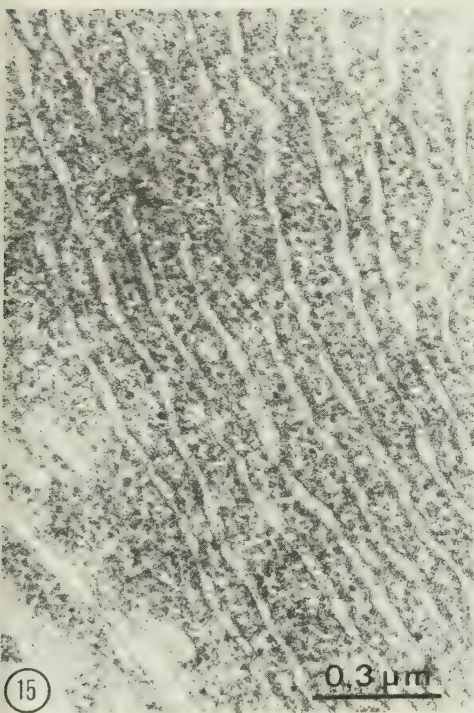
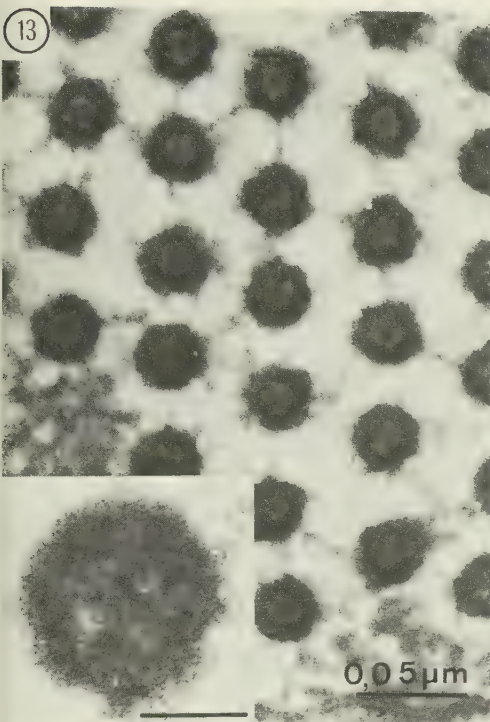
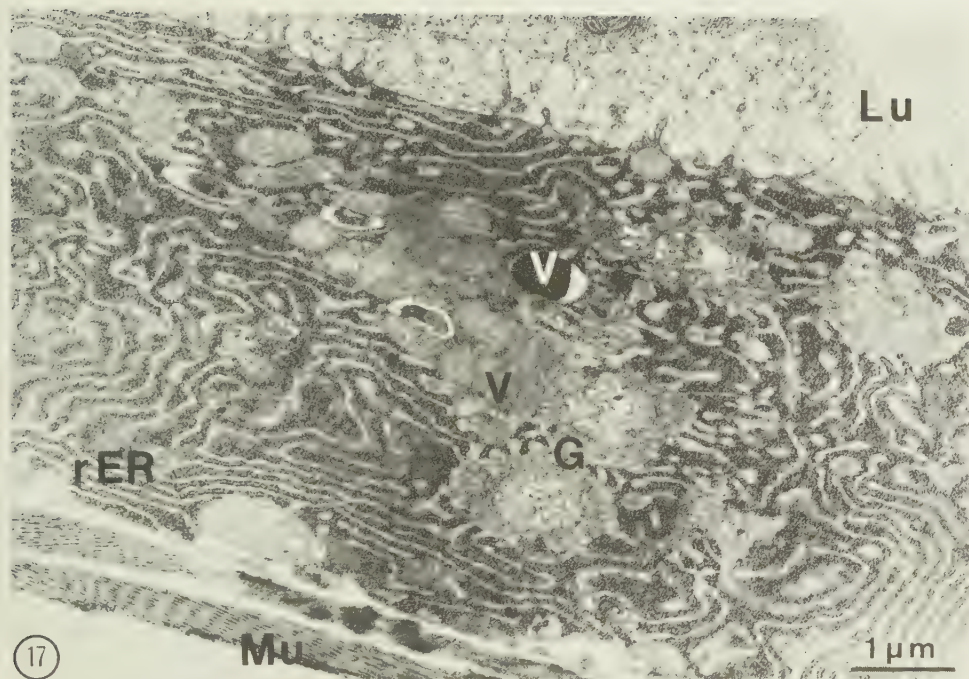
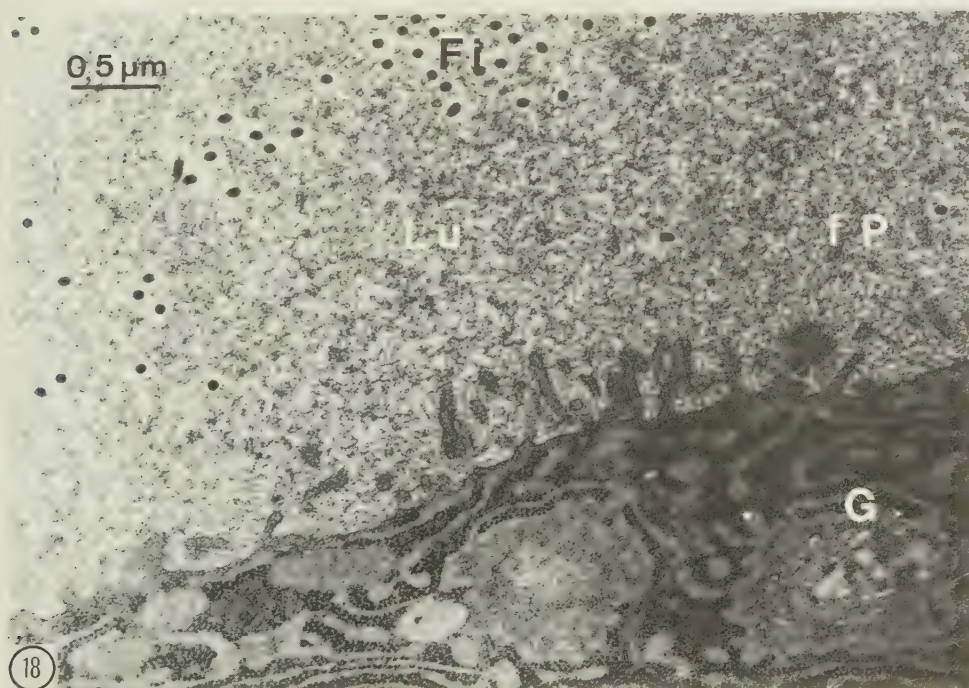


Abb. 17 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Ausschnitt aus einer Hauptzelle. Das rER weist eine Labyrinth-Form auf. Golgi-Apparate sind zahlreich vorhanden, aber inaktiv. Vakuolen sind klein, oft mit filzig-faserigem, wenig elektronendichtem Inhalt.

Abb. 18 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Ausschnitt aus dem Lumen. Das Lumen ist prall gefüllt mit mässig elektronendichtem flockigem Material. Filamente ($500 \text{ \AA}$) durchqueren das Lumen meist in losen Verbänden.

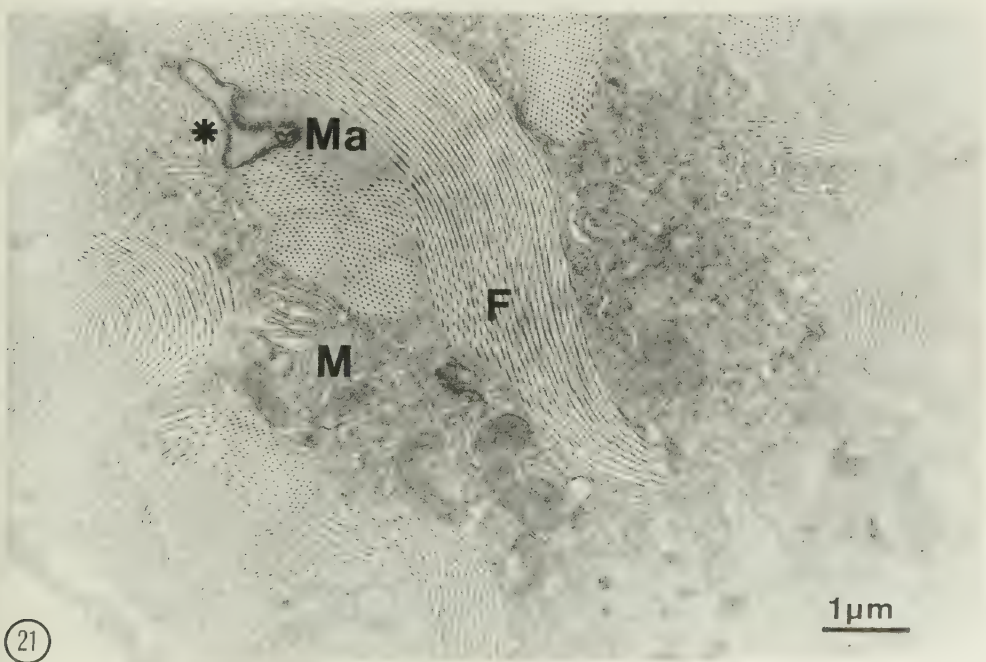
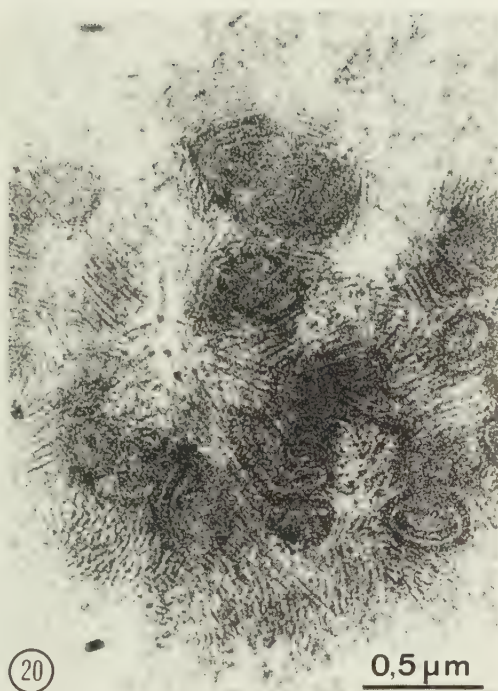
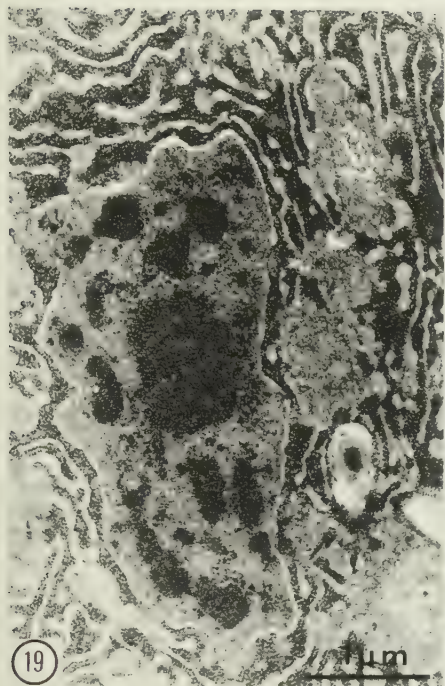


17



18

- Abb. 19 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Zellkern einer Hauptzelle. Der Zellkern ist in diesem Stadium stark gelappt und oft mit Heterochromatin-ähnlichem Material versehen.
- Abb. 20 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Lumen-Ausschnitt. Nur in diesem Stadium wurden spirale Filament-Bündel gefunden. Diese Bündel sind weniger dicht gepackt und weisen spiralförmige Strukturen auf. Möglicherweise betrachtet man hier den Ablauf einer Umlagerung. Immerhin weisen die Spiralen etwa einen ähnlichen Durchmesser wie Lumenfilamente auf. Vergleiche mit den angeschnittenen Lumenfilamenten links oben bzw. links unten.
- Abb. 21 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Ausschnitt aus einer Sekundärzelle. Die Zelle ist etwa zu 70% mit Filamentkörperchen ausgefüllt. Diese weisen, offenbar aus Platzgründen, nicht mehr die spulenartige Konfiguration auf, sondern verdrehen sich zu einer "twist"-Form, wobei der Matrix-Kern häufig neben die mächtigen Filamentstränge zu liegen kommt. Oft werden Membranreste unbekannter Herkunft gefunden (Stern). Diese sind möglicherweise ein Produkt der Konfigurationsänderung.



- Abb. 22 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Rasteraufnahme. Die Drüse ist so gebrochen, dass der Sekret-Pfropfen sich vom Drüsenepithel abhebt.
- Abb. 23 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Rasteraufnahme. Sicht aus dem Lumen auf die Zelloberfläche. Die zahlreich vorhandenen Mikrovilli sind zum Teil blasenförmig erweitert.

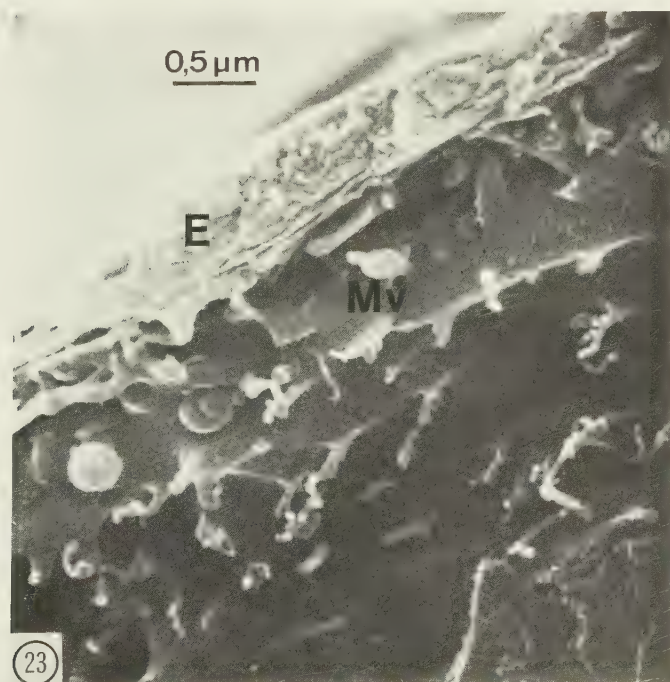
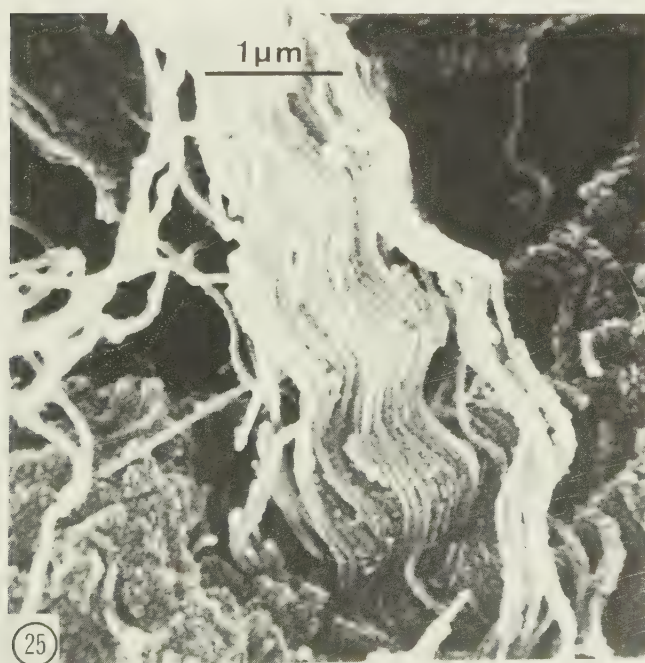
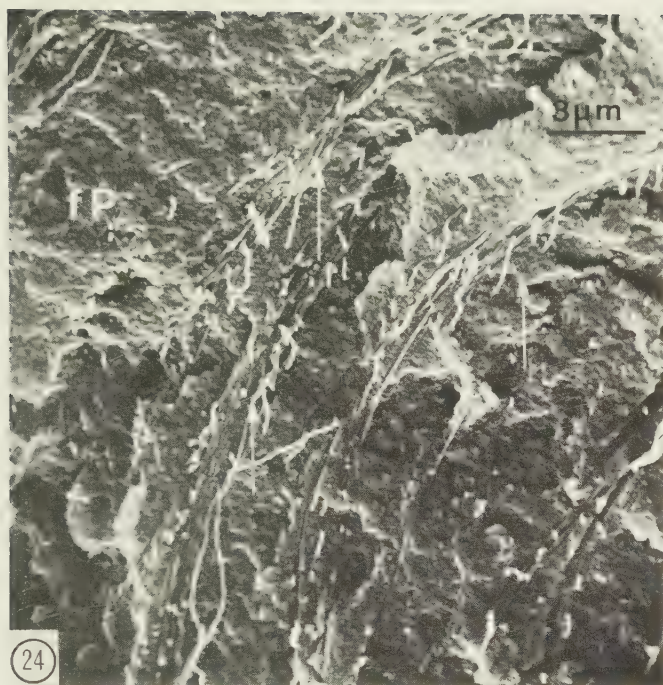


Abb. 24 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Rasteraufnahme. Ausschnitt aus dem Lumen. Die heterogenen, flockigen Proteine bilden den Hauptbestandteil des Sekrets. Darin eingelagert sind Scharen von Lumenfilamenten.

Abb. 25 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Rasteraufnahme. Ausschnitt aus dem Lumen. Bündel von Lumenfilamenten verlaufen meist wellenartig. Auffallend ist die relativ dichte Anordnung dieser Filament-Schar.



- Abb. 26 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Ausschnitt aus einem Filamentkörperchen bei sehr hoher Vergrößerung. Um die Struktur zu verdeutlichen, wurde sie bei einem Filament eingezeichnet. Diese weist zirkulär 10 Untereinheiten auf und 2 weitere im Zentrum. Der Durchmesser eines Filaments beträgt $300-340 \text{ \AA}$.
- Abb. 27 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Ausschnitt aus Abb. 28 bei hoher Vergrößerung. Der Balken entspricht $0,03 \text{ \mu m}$.
- Abb. 28 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. Schnitt durchs Lumen. Die Lumenfilamente sind quer getroffen, wobei eine ähnliche Struktur wie bei den Filamenten in Abb. 26 festgestellt werden kann. Der Durchmesser der Lumenfilamente beträgt ungefähr $500 \text{ \AA}$. Meistens sind die stark elektronendichten Lumenfilamente von schwach elektronendichtem Material umgeben, was im Querschnitt zur Bildung eines hellen Hofes führt.
- Abb. 29 Negativ-Kontrastierung einer Paragonien-Sekret-Präparation aus 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliegen (2% Uranylacetat). - Die (globulären ?) Untereinheiten des Lumenfilaments weisen eine helikale Anordnung auf.

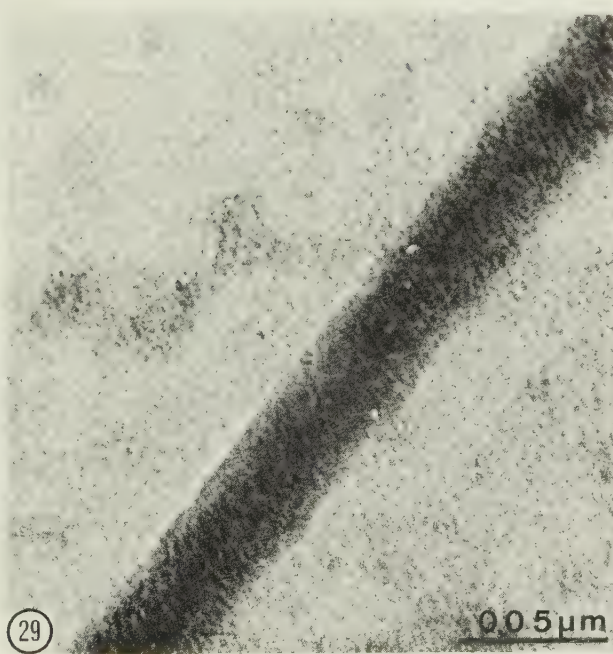
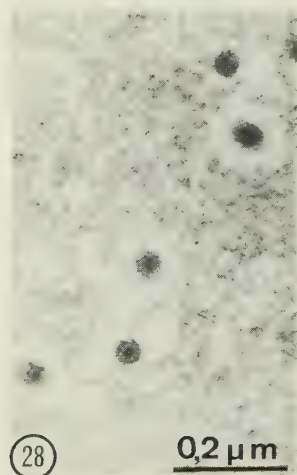
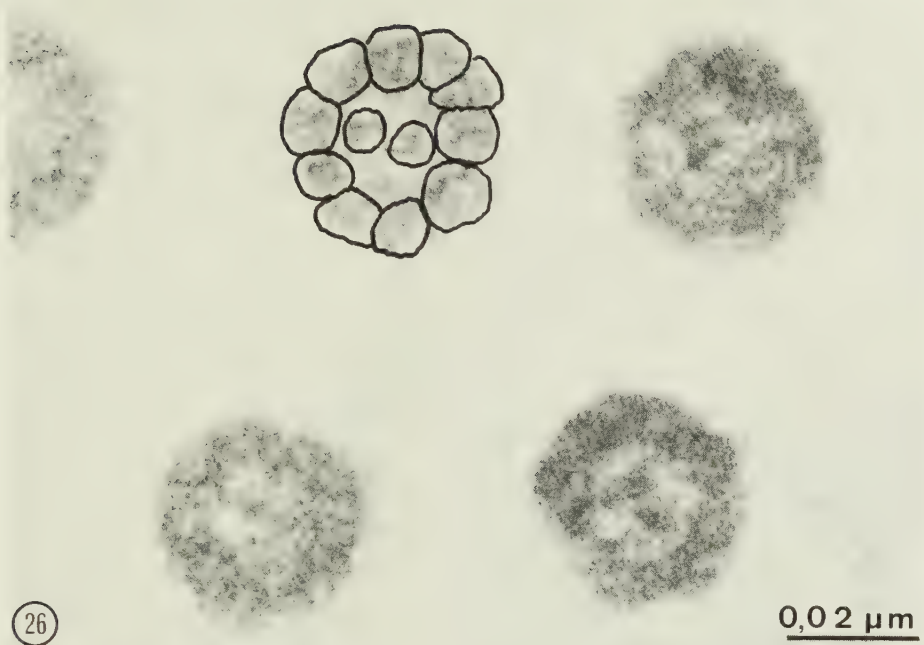


Abb. 30 Rekonstruktion eines Lumenfilaments. 10 zirkulär angeordnete Untereinheiten bilden einen Hohlzylinder indem 2 kleinere Untereinheiten verlaufen. Die Aussenfläche des Hohlzylinders weist globulären Charakter auf. Diese globulären Proteine sind helikal angeordnet.

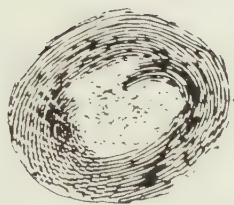
Abb. 31 Negativ-Kontrastierung einer Paragonien-Sekret-Präparation aus 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliegen. (2% PWS). Die typische Hohlzylindernatur des Lumenfilaments ist erkennbar. Die zentralen Untereinheiten sind schwach sichtbar.



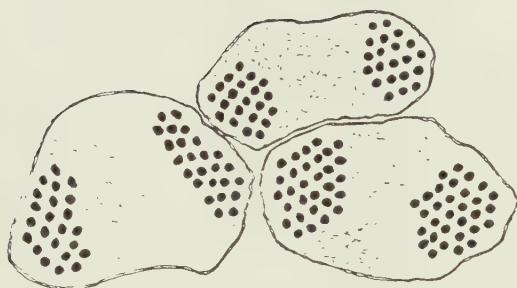
Abb. 32 a-d Halbschematische Darstellung der Bildung und der sekundären Umlagerungen von Filamentkörperchen.

- a. Längsgeschnittener "filamentous body" mit wenigen Filamenten (entspricht Abb. 4). Deutlich erkennt man die Spulenfunktion der Matrix.
- b. Quergeschnittene einzelne Filamentkörperchen mit hexagonaler Kristallstruktur (entspricht Abb. 5).
- c. Fusionsprodukt aus 3 filamenthaltigen Körperchen. Die Kristallstruktur verhält sich recht konservativ, sodass - aufgrund der Filamentanordnung - auf ursprünglich 3 einzelne Filamentkörperchen geschlossen werden kann. In der Mitte des Fusionsproduktes sind Membranreste angedeutet, die gelegentlich noch schwach erkennbar sind (Vergleiche Abb. 12).
- d. Filamentkörperchen in "twist"-Form. - Die Filamente sind verdreht und die Matrix verliert ihre Spulenfunktion (Vergleiche Abb. 21). Die eingezeichneten Filamente (Striche) entsprechen dem im betreffenden Präparat gefundenen Ausschnitt. Vergleiche auch Abb. 56.

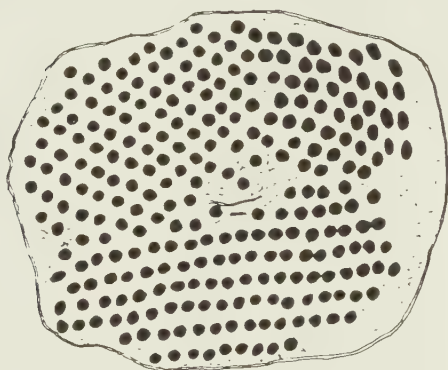
Abb. 32



a



b



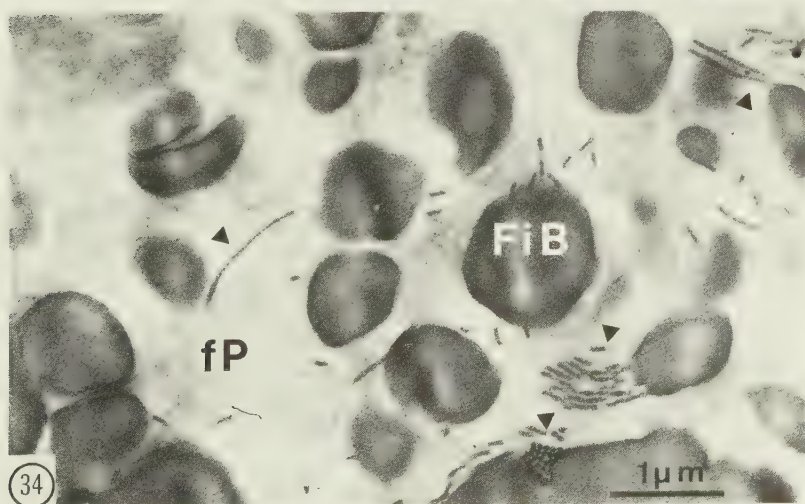
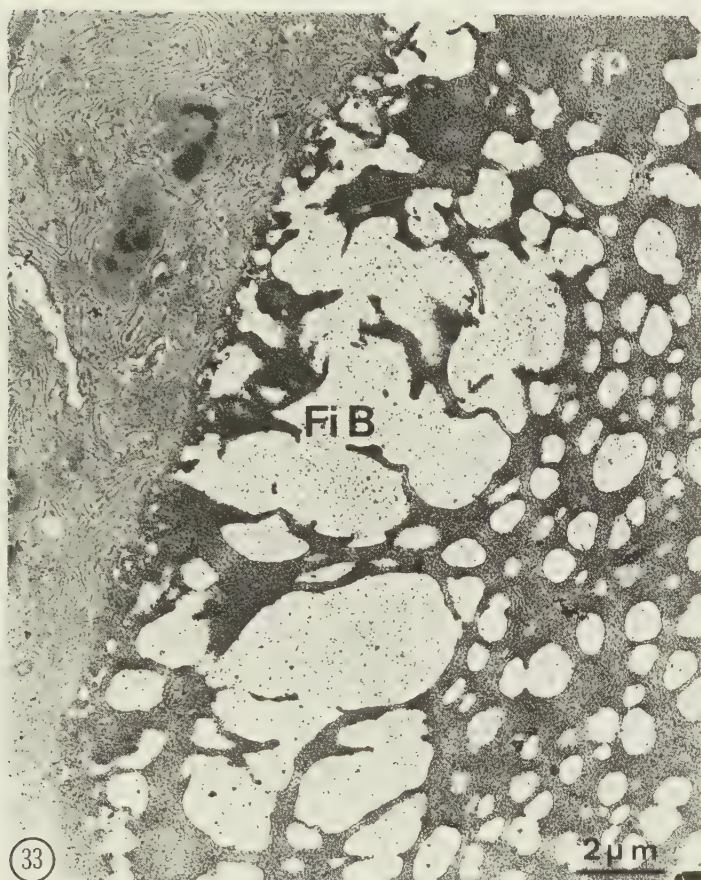
c



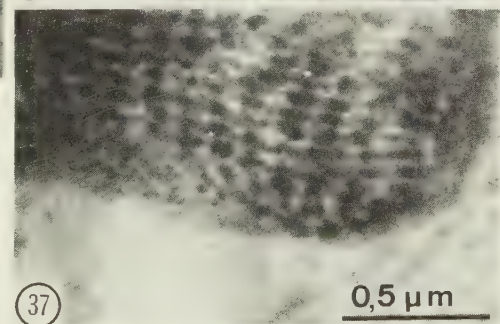
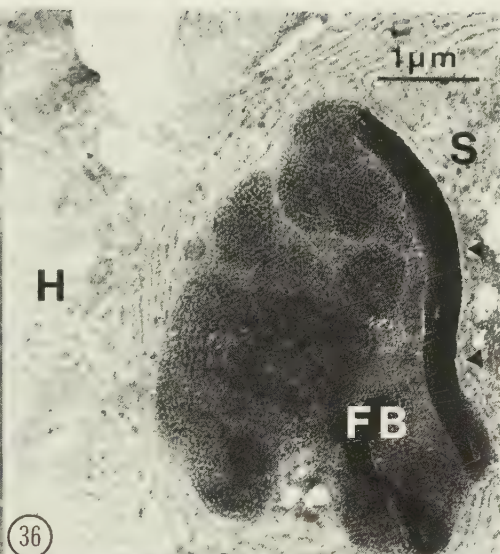
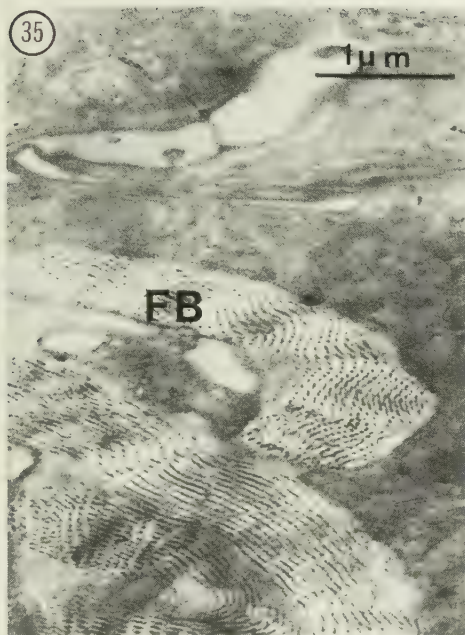
d

Abb. 33 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. (Meerrettich-Peroxidase-Technik). Uebersicht. - Die Filamentbündel im Lumen sind nicht markiert, hingegen sind die flockigen Proteine, die den grössten Teil des Lumens ausfüllen, sehr stark markiert. Die angrenzenden Hauptzellen sind nicht markiert.

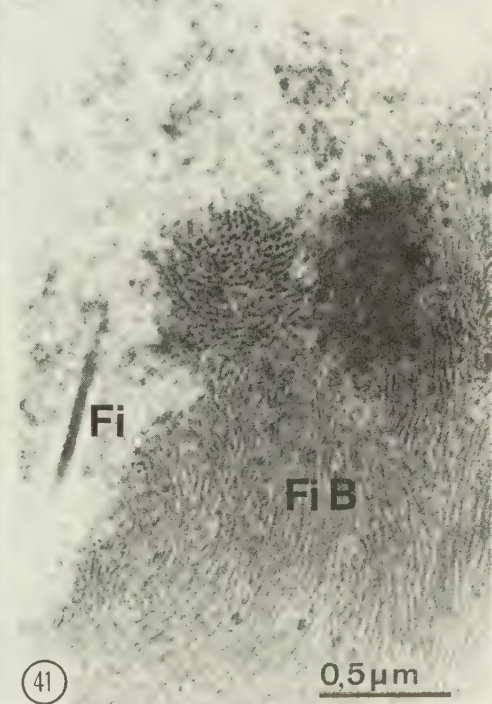
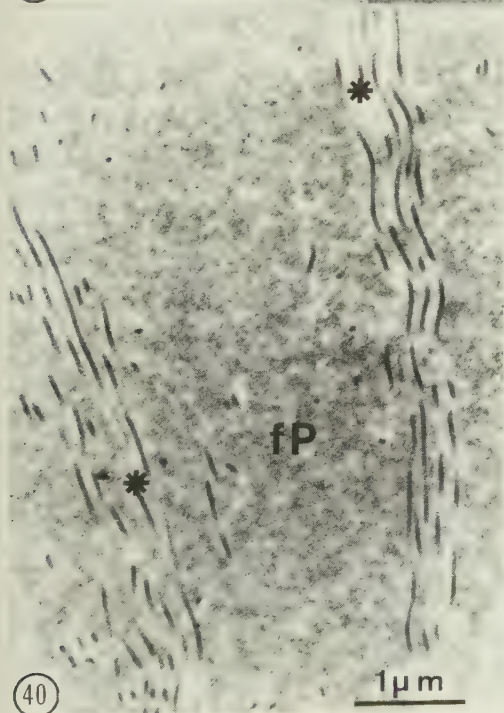
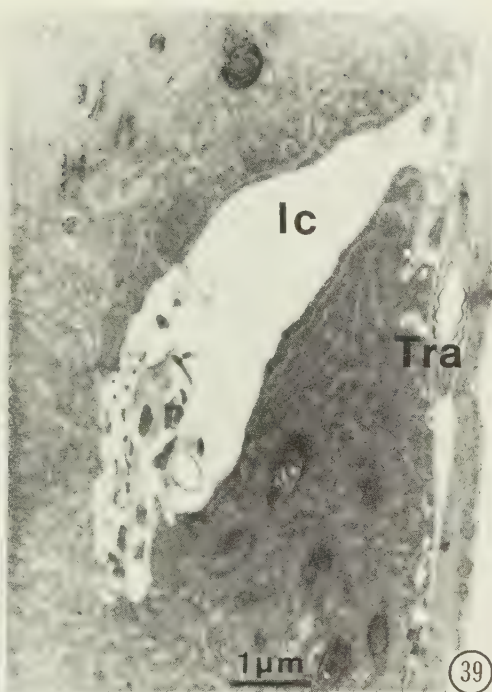
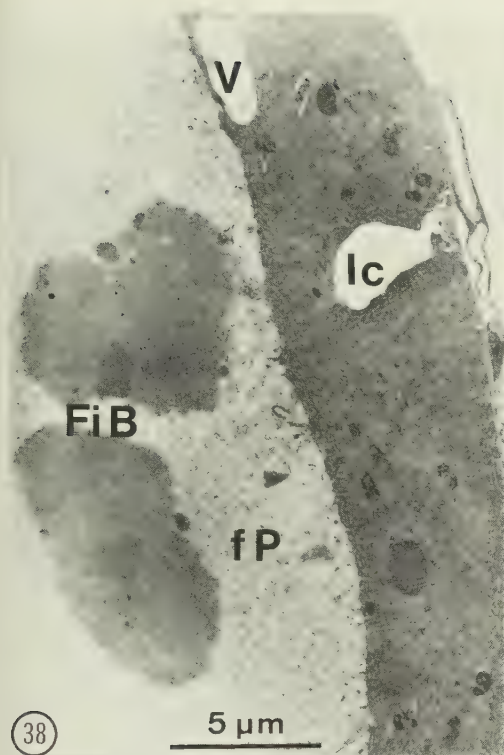
Abb. 34 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. (Meerrettich-Peroxidase-Technik). Nicht behandelter Schnitt als Kontrolle. Lumenausschnitt mit Filamentbündeln und flockigen Proteinen. Pfeile weisen auf Lumenfilamente hin.



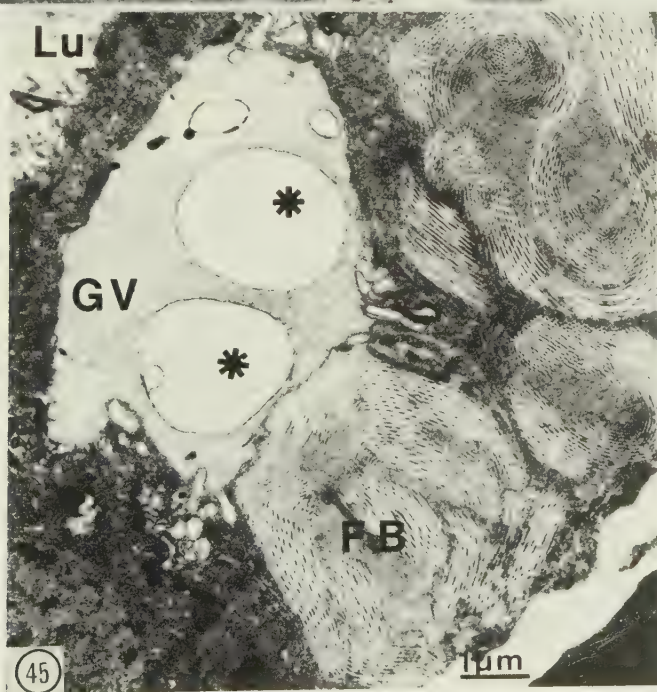
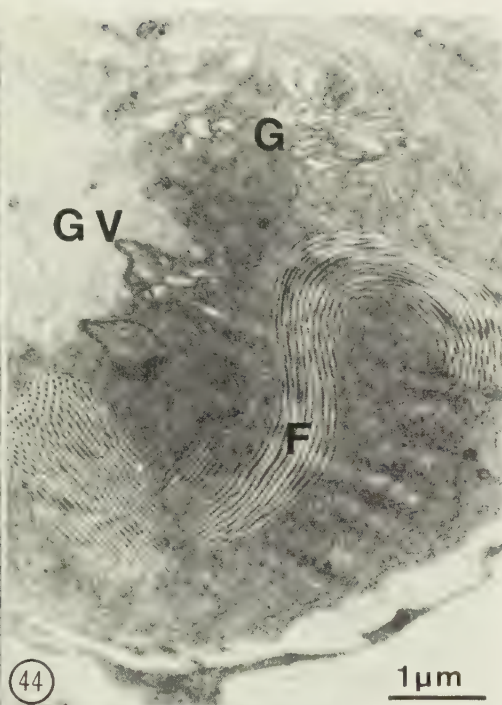
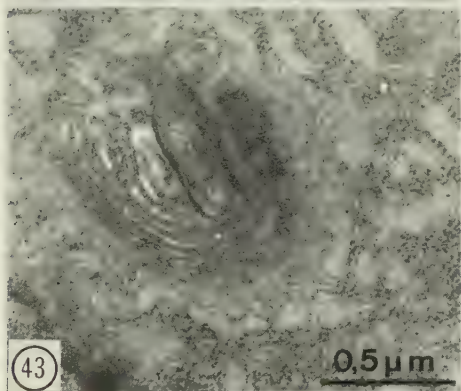
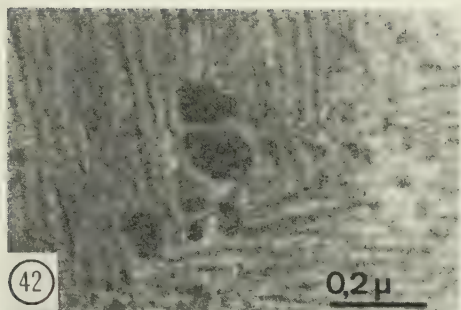
- Abb. 35 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. (Meerrettich-Peroxidase-Technik). Kontrolle: Der Schnitt wurde mit Präimmunserum behandelt. Die abgebildeten Filamentkörperchen sind nicht markiert.
- Abb. 36 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. (Meerrettich-Peroxidase-Technik). Der abgebildete "filamentous body" ist stark markiert. Pfeile = Falten im Schnitt.
- Abb. 37 Paragonium einer 7 Tage alten, isoliert gehaltenen Fliege. (Meerrettich-Peroxidase-Technik). Ausschnitt aus einem markierten Filamentkörperchen.



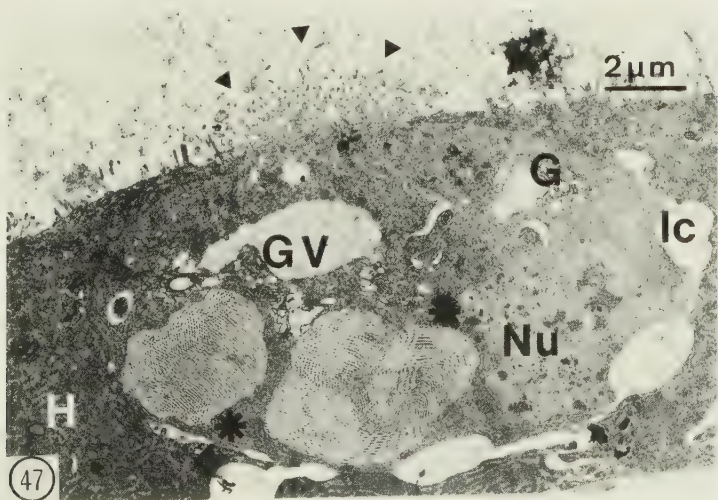
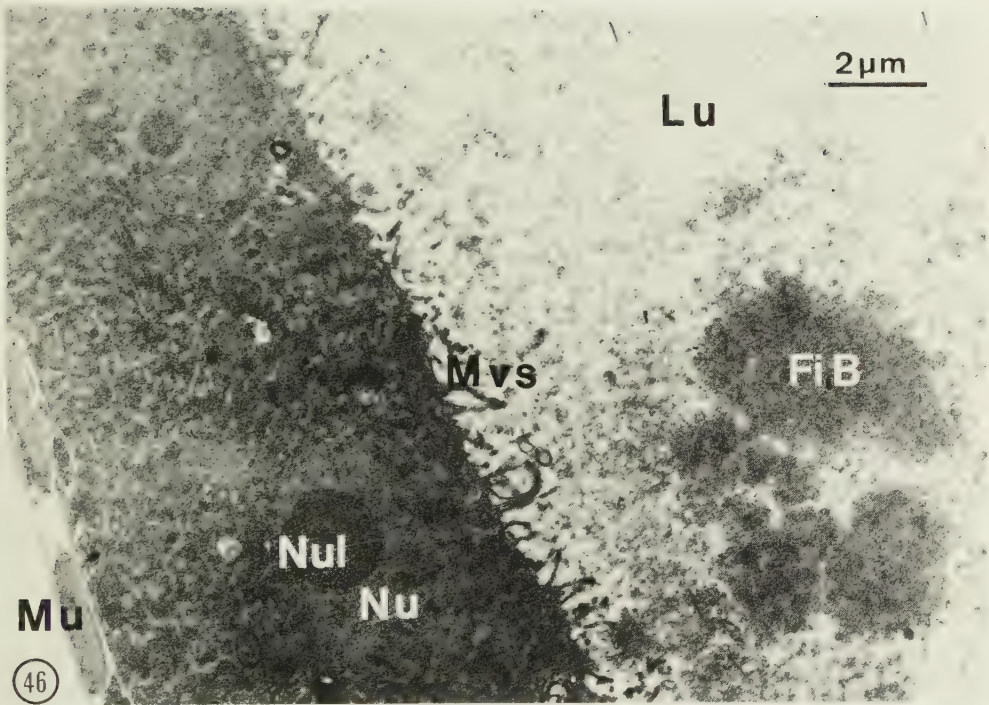
- Abb. 38 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Die Hauptzellen weisen wenig Vakuolen und Golgi-Apparate auf und sind synthetisch inaktiv. Grössere Interzellularräume (Ic) sind charakteristisch. Das Lumen ist gut gefüllt und zeigt alle wesentlichen Elemente: Filamentbündel (FiB), flockige Proteine (fP) und Lumenfilamente.
- Abb. 39 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. Interzellulärraum der teilweise mit Zelltrümmern gefüllt ist. Hauptzelle.
- Abb. 40 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Lumenausschnitt. Das Sekret ist ziemlich dicht gepackt. Filamentscharen (Sterne) sind in flockige Proteine eingelagert.
- Abb. 41 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Lumenausschnitt bei stärkerer Vergrösserung. Die Filamentbündel sind meist unregelmässig gepackt, am Rande oft zerfliessend. Regelmässig treten elektronendichtere Stellen auf (Sterne), deren Struktur unklar ist. Möglicherweise sind hier Ueberschneidungsstellen von längs und quer verlaufenden Einheiten getroffen.



- Abb. 42 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Filamentbündel bei stärkerer Vergrößerung. Beachte den Richtungsverlauf der einzelnen Einheiten.
- Abb. 43 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Inaktiver Golgi-Apparat einer Hauptzelle.
- Abb. 44 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Sekundärzelle. Beachte die völlig anders gestaltete Golgi-Region der Sekundärzelle. Die Filamentkörperchen liegen in "twist"-Form vor.
- Abb. 45 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens nach 5 Minuten Kopulationsdauer. - Sekundärzelle. In der "grauen" Vakuole bilden sich häufig "leere" Vakuolen (Stern).



- Abb. 46 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 5 Minuten nach erfolgter Kopulation. - Uebersicht. Die Hauptzellen sind unverändert synthetisch inaktiv. Es sind keine Vakuolen vorhanden. Das Lumen ist vergleichsweise weniger elektronendicht, weist aber alle Elemente auf: Flockige Proteine - deutlich weniger -, Filamentbündel und Lumenfilamente.
- Abb. 47 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 5 Minuten nach erfolgter Kopulation. - Sekundärzelle. Der Mikrovilli-Saum dieser Zelle ist in diesem Zeitpunkt sehr stark ausgeprägt (Pfeile). Die filamenthaltigen Körperchen (Sterne) sind Fusionsprodukte aus mehreren kleineren Filamentkörperchen. Auffallend sind die grossen Interzellularräume.



- Abb. 48 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 1 Stunde nach erfolgter Kopulation. - Sekundärzelle. Die "filamentous bodies" nehmen ungefähr 60-70% des totalen Zellvolumens ein.
- Abb. 49 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 1 Stunde nach erfolgter Kopulation. - Hauptzellen, im äussersten apikalen Teil quer geschnitten. Beachte: Die Zellen sind an der Lumen-grenze nicht miteinander verbunden.
- Abb. 50 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 1 Stunde nach erfolgter Kopulation. - Sekundärzelle. Detailaufnahme der Golgi-Region. Beachte den Unterschied zum Golgi-Apparat der Hauptzellen.

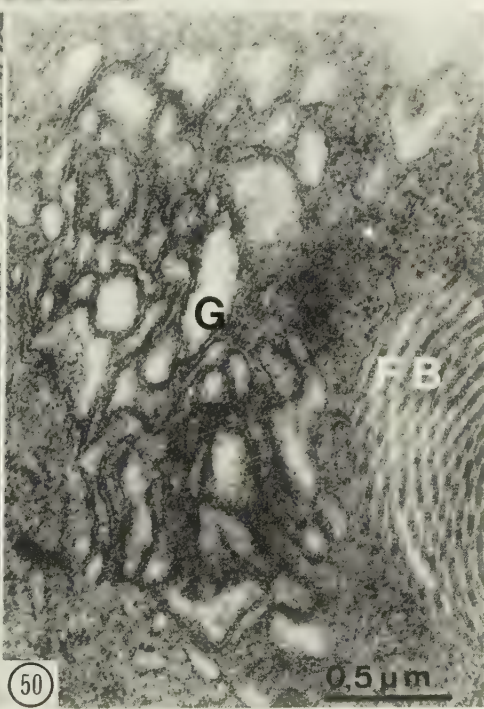
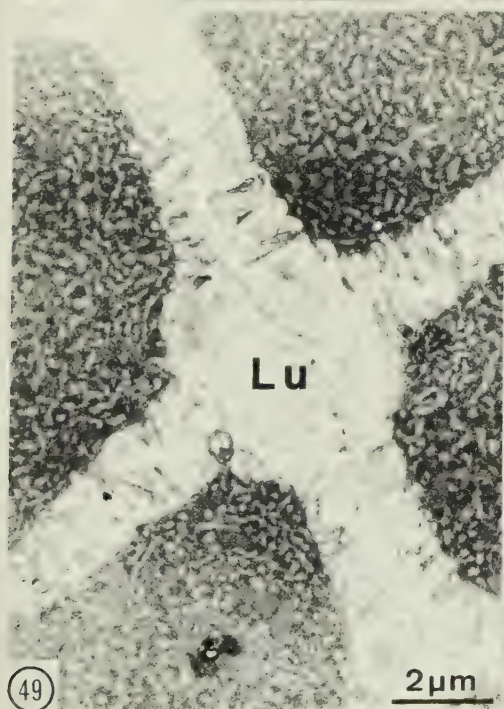
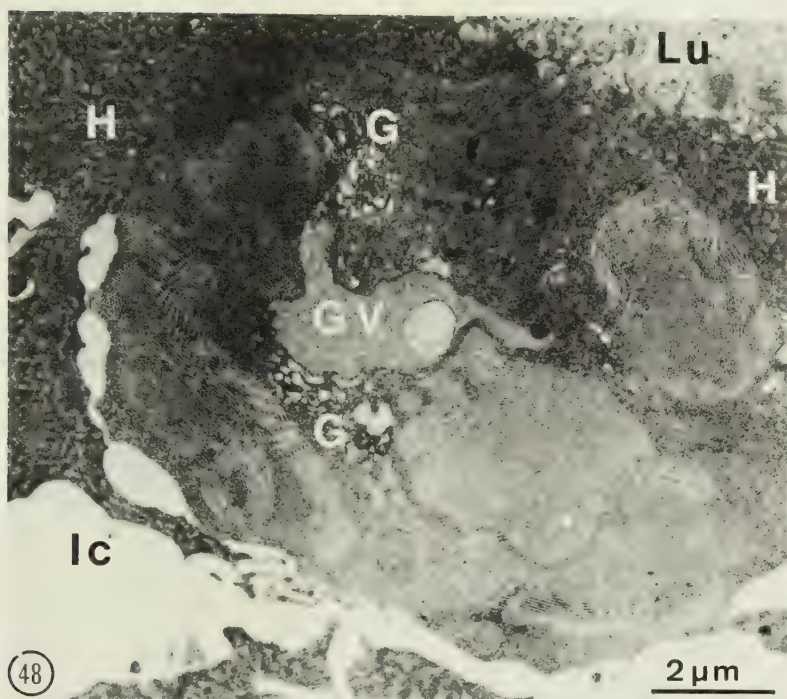
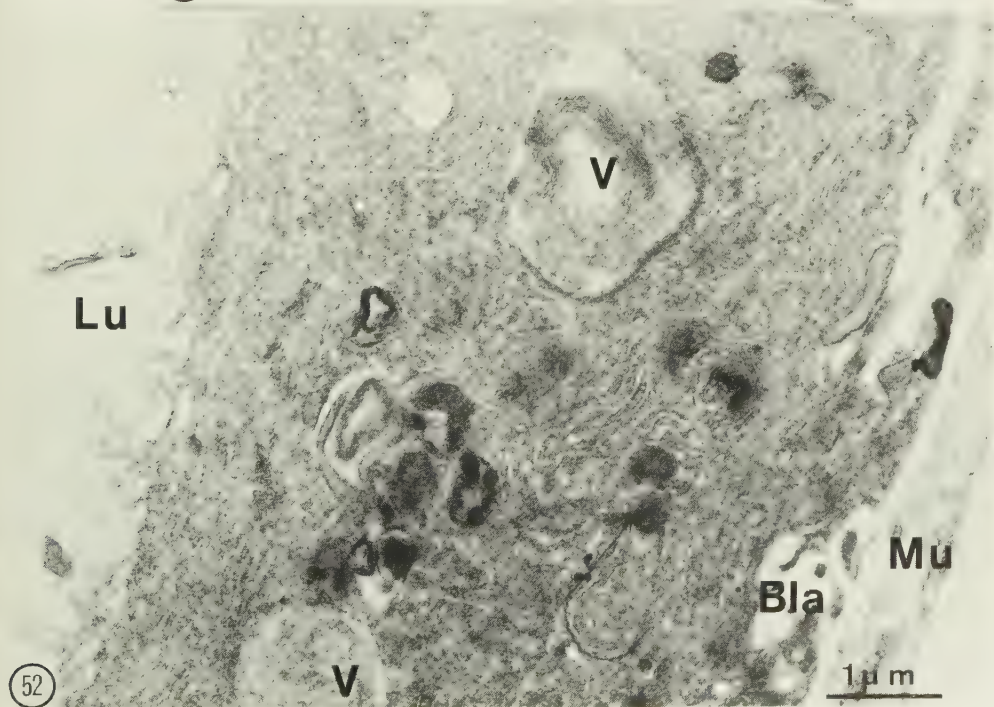
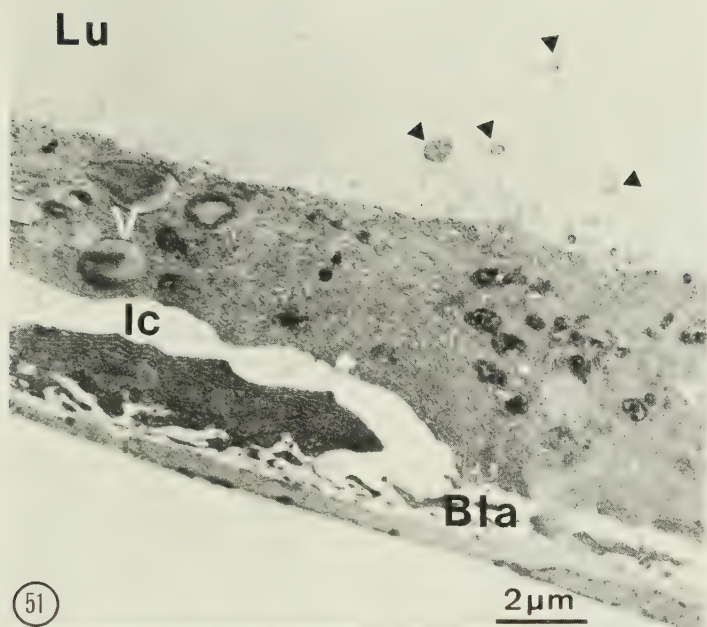


Abb. 51 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 3 Stunden nach der Kopulation. - Uebersicht. Die Hauptzellen weisen eine überaus starke Vakuolentätigkeit auf. In der Nähe der Golgi-Apparate findet sich stark elektronendichtes Material. Das Basallabyrinth und die Interzellularräume sind ausgeprägt. Das Lumen weist, nebst den üblichen Komponenten, leere Vesikel und Vakuolenreste auf (Pfeile).

Abb. 52 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 3 Stunden nach erfolgter Kopulation. - Ausschnitt aus einer Hauptzelle. Es finden sich Vakuolen mit flockigem Inhalt (unten links), solche mit stark elektronendichtem Inhalt (mitte) und andere mit faserigem Inhalt (oben).



- Abb. 53 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens 3 Stunden nach erfolgter Kopulation. - Ausschnitt aus einer Hauptzelle. Zu diesem Zeitpunkt finden sich sehr häufig riesige Vakuolen, die aufgrund ihres heterogenen Inhalts wahrscheinlich Fusionsprodukte mehrerer kleiner Vakuolen sind. In diesem Falle findet man flockiges, mässig elektronendichtes und faserig stark elektronendichtes Material.
- Abb. 54 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens (Kontrolle). - Lumenausschnitt. Das Lumen zeigt nebst den üblichen Komponenten in diesem Falle sehr viele Filamentbündel und flockige Proteine.
- Abb. 55 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens (Kontrolle). - Uebersicht. Die Hauptzellen haben einen gerundeten Kern. Das rER ist cisternen- bis labyrinthartig ausgebildet. Golgi-Apparate sind inaktiv, Vakuolen eher selten.

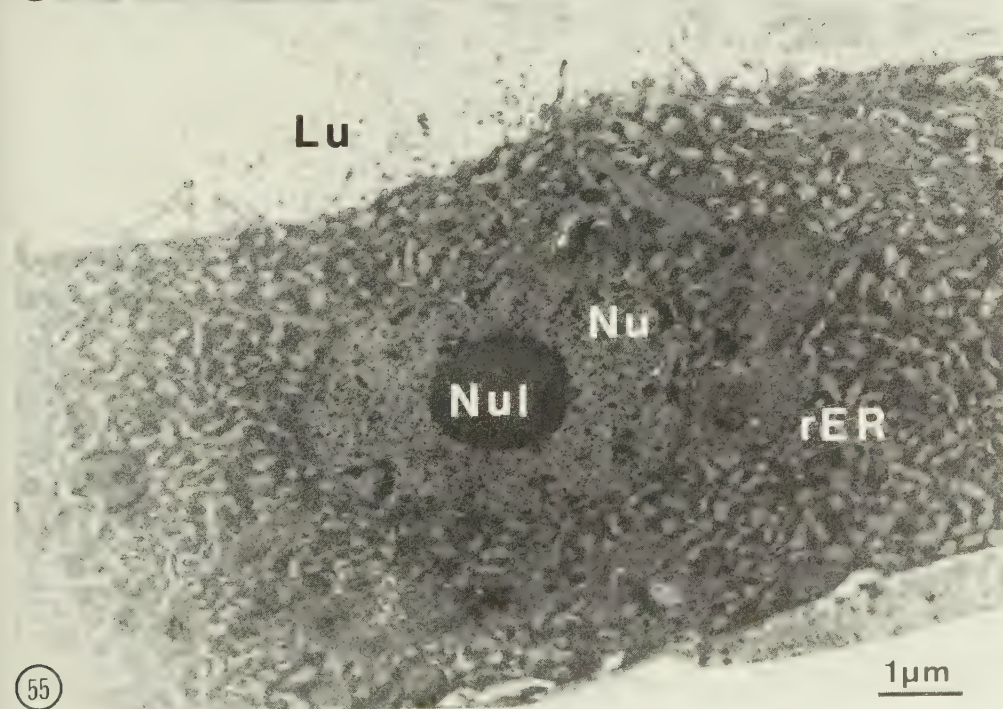
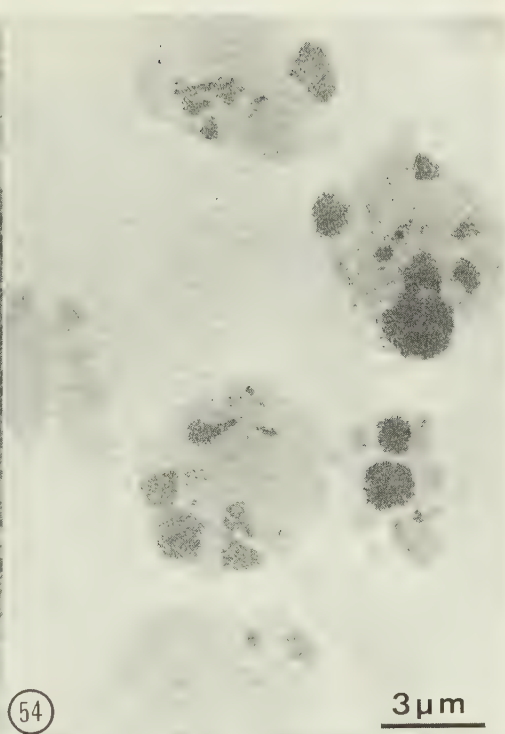
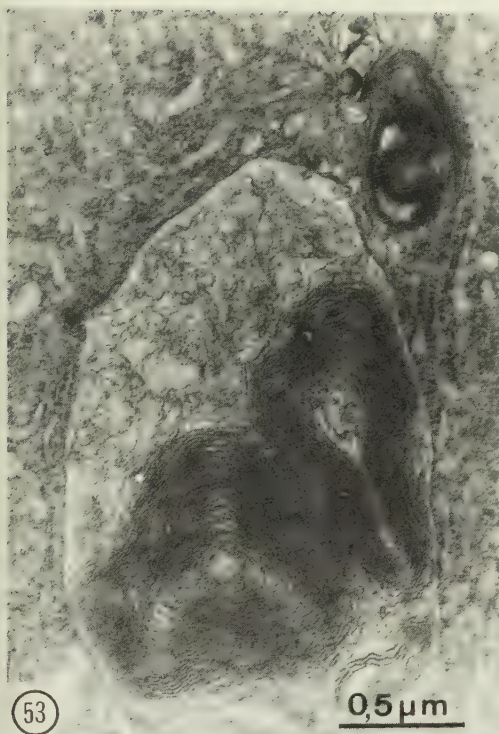
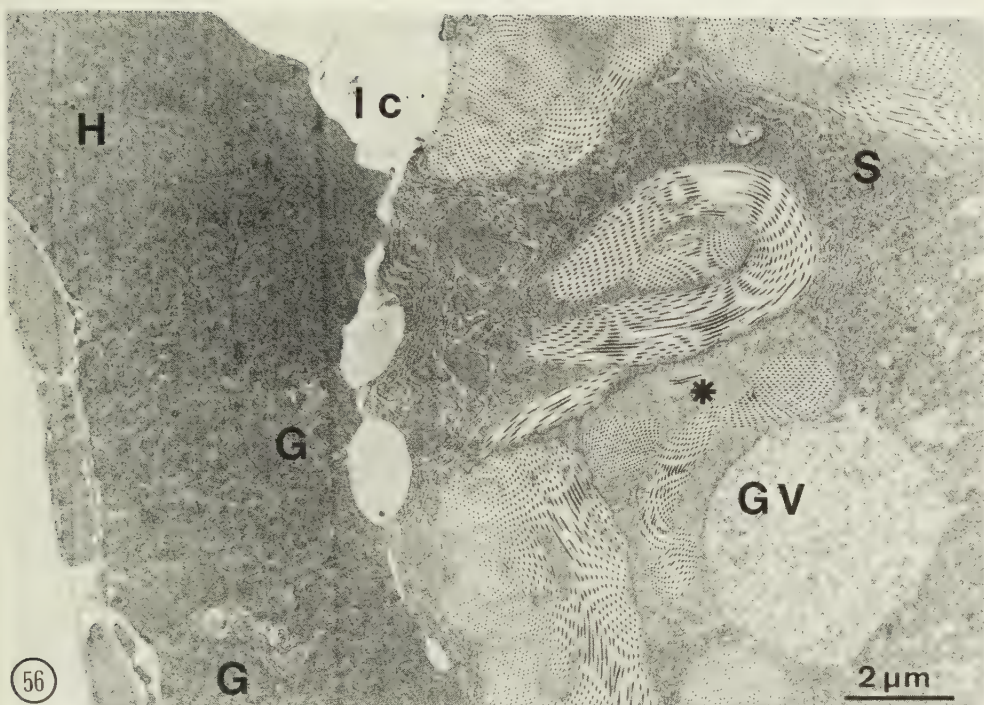


Abb. 56 Paragonium eines 4 Tage alten, isoliert gehaltenen Männchens (Kontrolle). Uebersicht. - Die Golgi-Apparate in den Hauptzellen sind klein und inaktiv. Die Interzellularräume zwischen Haupt- und Sekundärzellen sind offenbar bereits vor der Kopulation vorhanden. Die Sekundärzelle ist mehrheitlich mit "filamentous bodies" ausgefüllt, wobei die Matrix (Stern) ihre Spulenfunktion bereits verloren hat. Die Filamentkörperchen liegen hier in "twist"-Form vor.



C U R R I C U L U M V I T A E

Ich, Johann Rudolph Federer, Bürger von Zürich und Berneck SG wurde am 19.4.1950 in Wädenswil (ZH) geboren. Von 1957 bis 1963 besuchte ich die Primarschule in Kreuzlingen (TG) und Zürich. Das Gymnasium absolvierte ich in Stans (6 Jahre) und Einsiedeln (2 Jahre) mit der Matura Typ B 1971. Anschliessend studierte ich an der Universität Zürich Biologie und erwarb 1977 das Diplom als Naturwissenschaftler. Von 1977 bis 1981 arbeitete ich an meiner Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. S. Chen. Seit 1974 bin ich als Assistent am Zoologischen Institut tätig.

Während meiner Studien an der Universität Zürich besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten: Bachofen, Baker, Batschelet, Biegert, Billeter, Birnstiel, Briegel, Burla, Chen, Christen, Cook, Egger, Endress, Hohl, Humbel, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kägi, Knüsel, Kubli, Kuhn-Schnyder, Kummer, Melli, Nöthiger, Oswald, Pfluger, Rast, Rieber, Rohweder, Roos, Schächli, Schlittler, Schneider, Schmid, Stüssi, Tardent, Thomas, Turner, Wanner, Weber, Wehner, Weissmann, Wilson und Ziswiler.

